

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA**

**UNIDAD DE POST-GRADO**

**Expresión de Citoquinas de la respuesta TH1 (Ifn $\gamma$  e Il2) y TH2 (Il4 e Il10) en mucosa intestinal de crías de alpaca (*Vicugna Pacos*) sanas y con Enteropatía**

**TESIS**

Para optar por el Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias  
con mención en Salud Animal.

Médico Veterinario

**AUTOR**

Kim Lam Roxana Chiok Casimiro

**Lima – Perú**

**2012**

## RESUMEN

El objetivo del estudio fue caracterizar la expresión de citoquinas características de la respuesta inmune adaptativa celular (Th1) y humoral (Th2) en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas y enfermas con enteropatía de cero a 45 días de edad. Se evaluó la expresión de ARNm de IFN $\gamma$  e IL2 (Th1) junto a IL4 e IL10 (Th2) a través de RT-PCR Tiempo Real y cuantificación relativa según el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  empleando el gen GAPDH como gen interno y en relación a animales calibradores recién nacidos que no han consumido calostro. Se encontró que la expresión de estas citoquinas es detectable a partir del nacimiento y que poseen una cinética ascendente y gradual que alcanza su máxima expresión entre la tercera y quinta semanas de edad en todas las citoquinas evaluadas en el grupo de animales sanos. Asimismo, se encontró pobre expresión de IL2 y una aparente polarización de la respuesta Th1 a través de expresión de IFN $\gamma$  por encima del resto de citoquinas. Existió diferencia estadística significativa en las comparaciones hechas de acuerdo a grupo sanitarios y edad, así como correlación positiva entre edad y expresión de citoquinas, soportando la observación de la cinética ascendente y el establecimiento de esta cinética como patrón de expresión en los animales sanos. En los animales enfermos, se observó expresión aumentada de todas las citoquinas con respecto a los animales sanos y calibradores, particularmente en el caso de IFN $\gamma$  e IL4, las que se regulan mutuamente y polarizan la respuesta inmune. No se halló un patrón específico ni correlación entre edad y expresión de citoquinas en este grupo.

**Palabras clave:** crías de alpaca, mucosa intestinal, Th1, Th2, ARNm, RT-PCR Tiempo Real, cuantificación relativa.

## ABSTRACT

The aim of this study was to characterize expression of cytokines belonging to the immune cellular (Th1) and humoral (Th2) adaptative responses in intestinal mucosa tissue from healthy and from sick newborn alpacas showing clinical signs of enteropathy, ages ranging from zero to 45 days. We assessed expression of mRNA levels of IFN $\gamma$  and IL2 (Th1) along with IL4 and IL10 (Th2) by means of Real Time RT-PCR and relative quantization according to the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method using the GAPDH gene as internal control and in relation to newborn animals which had not consumed any colostrum right after birth (calibrators). We found that expression of all these cytokines is detectable at the time of birth and it varies according to a gradual ascendant kinetics reaching its maximum expression between the third and fourth weeks of age in healthy animals. Also, IL2 is expressed poorly in this tissue while there is an apparent polarization towards Th1 responses, mainly due to high expression of IFN $\gamma$  which levels are always higher than the rest of cytokines. There was significant statistic difference when health status and age were compared, also positive correlation between age and levels of expression, supporting our observations regarding gradual ascendant kinetics as a pattern of cytokine expression in healthy animals. Enteropathic animals showed very elevated levels of cytokine expression when compared to healthy animals and calibrators, particularly in the case of IFN $\gamma$  and IL4, which in turn regulate each other and polarize immune responses towards Th1 and Th2, respectively. We could not find any specific expression pattern or positive correlation between age and cytokine expression in this group of animals.

**Key words:** newborn alpaca, intestinal mucosa, Th1, Th2, mRNA, Real Time RT-PCR, relative quantization.

## LISTA DE CONTENIDOS

|   | Pág. |
|---|------|
| Resumen   | 2    |
| Abstract  | 3    |
| Lista de contenidos   | 4    |
| Lista de cuadros  | 6    |
| Lista de Figuras  | 7    |
| Lista de Anexos   | 10   |
| I. Introducción   | 11   |
| II. Revisión bibliográfica                                  | 13   |
| 2.1. Camélidos Sudamericanos: La Alpaca                     | 13   |
| 2.1.1. Aspectos Sanitarios e inmunes en camélidos           | 13   |
| 2.2. Inmunidad de mucosa intestinal                         | 22   |
| 2.2.1. Respuesta inmune: modulación a través de citoquinas. | 28   |
| III. Materiales y Métodos                                   | 51   |
| 3.1. Animales y muestras                                    | 51   |
| 3.2. Toma de muestras                                       | 52   |
| 3.3. Procesamiento de muestras                              | 53   |
| 3.4. Extracción de ARN total                                | 53   |
| 3.5. Síntesis de ADNc                                       | 54   |
| 3.6. PCR Tiempo Real  | 55   |
| 3.7. Cuantificación relativa                                | 58   |
| 3.8. Análisis Estadístico                                   | 59   |
| IV. Resultados  | 60   |
| 4.1. Citoquinas de la respuesta Th1                         | 60   |
| 4.1.1. RT-PCR Tiempo Real: IFN $\gamma$                     | 62   |

|                                     |     |
|-------------------------------------|-----|
| 4.1.2. RT-PCR Tiempo Real: IL-2     | 67  |
| 4.2. Citoquinas de la respuesta Th2 | 72  |
| 4.2.1. RT-PCR Tiempo Real: IL-4     | 74  |
| 4.2.2. RT-PCR Tiempo Real: IL-10    | 80  |
| 4.3. Histopatología                 | 86  |
| V. Discusión                        | 88  |
| VI. Conclusiones                    | 101 |
| VII. Bibliografía                   | 102 |
| VIII. Anexos                        | 117 |

## Lista de cuadros

Pág.

**Cuadro 1.** Oligonucleótidos empleados para la técnica RT-PCR Tiempo Real de las citoquinas de la respuesta Th1 y Th2 en alpacas.

56

**Cuadro 2.** Frecuencia relativa de productos amplificados mediante RT-PCR tiempo real empleando oligonucleótidos contra IFN $\gamma$  en ARN obtenido de intestino de crías de alpaca, según temperatura de disociación.

63

**Cuadro 3.** Frecuencia relativa de productos amplificados mediante RT-PCR tiempo real empleando oligonucleótidos contra IL-2 en ARN obtenido de intestino de crías de alpaca, según temperatura de disociación.

69

**Cuadro 4.** Frecuencia relativa de productos amplificados mediante RT-PCR tiempo real empleando oligonucleótidos contra IL-4 en ARN obtenido de intestino de crías de alpaca, según temperatura de disociación.

76

**Cuadro 5.** Frecuencia relativa de productos amplificados mediante RT-PCR tiempo real empleando oligonucleótidos contra IL-10 en ARN obtenido de intestino de crías de alpaca, según temperatura de disociación.

82

## **Lista de Figuras**

|  | Pág. |
|--|------|
| Fig. 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos amplificados con oligonucleótidos IFN $\gamma$ .   | 60   |
| Fig. 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos amplificados con oligonucleótidos IL-2.  | 61   |
| Fig. 3. Temperatura de disociación de productos de RT-PCR amplificados con oligonucleótidos para IFN $\gamma$ en ARN de intestino delgado de crías de alpaca sanas.    | 63   |
| Fig. 4. Niveles de expresión de IFN $\gamma$ en mucosa intestinal de crías de alpaca enfermas y sanas con respecto al calibrador.                                      | 64   |
| Fig. 5. Niveles de expresión de IFN $\gamma$ en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas por semanas de edad con respecto al calibrador.                             | 65   |
| Fig. 6. Niveles de expresión de IFN $\gamma$ en mucosa intestinal de crías de alpaca con enteropatía por semanas de edad con respecto al calibrador.                   | 66   |
| Fig. 7. Niveles de expresión de IFN $\gamma$ en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas y enfermas por semanas de edad.   | 67   |
| Fig. 8. Temperatura de disociación de productos de RT-PCR amplificados con oligonucleótidos para IL-2 en ARN de intestino delgado de crías de alpaca sanas y enfermas. | 68   |
| Fig. 9. Niveles de expresión de IL-2 en mucosa intestinal de crías de alpaca enfermas y sanas con respecto al calibrador.  | 69   |
| Fig. 10. Niveles de expresión de IL-2 en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas con respecto al calibrador.  | 70   |
| Fig. 11. Niveles de expresión de IL-2 en mucosa intestinal de crías de alpaca con enteropatía por edad con respecto al calibrador.                                     | 71   |

|   |    |
|---|----|
| Fig. 12. Niveles de expresión de Il-2 en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas y enfermas por semanas de edad.   | 72 |
| Fig. 13. Electroforesis en gel de agarosa de 1.5% de los productos amplificados con oligonucleótidos IL-4.  | 73 |
| Fig. 14. Electroforesis en gel de agarosa de 1.5% de los productos amplificados con oligonucleótidos IL-10.   | 74 |
| Fig. 15. Temperatura de disociación de productos de RT-PCR amplificados con oligonucleótidos para IL-4 en ARN de intestino delgado de crías de alpaca sanas y enfermas. | 75 |
| Fig. 16. Niveles de expresión de Il-4 en mucosa intestinal de crías de alpaca enfermas y sanas con respecto al calibrador.  | 77 |
| Fig. 17. Niveles de expresión de Il-4 en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas, según edad, con respecto al calibrador.  | 78 |
| Fig. 18. Niveles de expresión de Il-4 en mucosa intestinal de crías de alpaca con enteropatía, según edad, con respecto al calibrador.                                  | 79 |
| Fig. 19. Niveles de expresión de Il-4 en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas y con enteropatía, según edad, con respecto al calibrador.                          | 80 |
| Fig. 20. Temperatura de disociación de productos de RT-PCR amplificados con oligonucleótidos para IL-10 en ARN de intestino delgado de crías de alpaca sanas.           | 81 |
| Fig. 21. Niveles de expresión de Il-10 en mucosa intestinal de crías de alpaca enfermas y sanas con respecto al calibrador.   | 82 |
| Fig. 22. Niveles de expresión de Il-10 en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas, según edad, con respecto al calibrador.   | 83 |
| Fig. 23. Niveles de expresión de Il-10 en mucosa intestinal de crías de alpaca con enteropatía, según edad, con respecto al calibrador.                                 | 85 |



Fig. 24. Niveles de expresión de Il-10 en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas y con enteropatía, según edad, con respecto al calibrador. 86

Fig. 25. Frecuencia de lesiones histopatológicas en mucosa intestinal de crías de alpaca enfermas con enteropatía. 87

## Lista de anexos

|   | Pág. |
|---|------|
| <b>Anexo 1.</b> Árbol filogenético elaborado a partir del alineamiento de una secuencia de IL-2 (Odbileg y col., 2006).   | 117  |
| <b>Anexo 2.</b> Árbol filogenético elaborado a partir del alineamiento de una secuencia de IL-10 (Odbileg y col., 2006).  | 118  |
| <b>Anexo 3.</b> Valores promedio de Ct de IFN $\gamma$ , GAPDH, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , varianza, Desviación estándar* y Coeficiente de variación** hallados en animales sanos y enfermos con enteropatía.  | 119  |
| <b>Anexo 4.</b> Valores promedio de Ct de IL-2, GAPDH, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , varianza, Desviación estándar* y Coeficiente de variación** hallados en animales sanos y enfermos con enteropatía.   | 120  |
| <b>Anexo 5.</b> Valores promedio de Ct de IL-4, GAPDH, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , varianza, Desviación estándar* y Coeficiente de variación** hallados en animales sanos y enfermos con enteropatía.   | 121  |
| <b>Anexo 6.</b> Valores promedio de Ct de IL-10, GAPDH, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , varianza, Desviación estándar* y Coeficiente de variación** hallados en animales sanos y enfermos con enteropatía.  | 122  |
| <b>Anexo 7.</b> Resultados del Software Stata SE 10.1 para: a) la comparación sanos y enfermos para IFN $\gamma$ (T de Student), b) expresión de IFN $\gamma$ en animales sanos según semana de edad (ANOVA), c) expresión de IFN $\gamma$ en animales enfermos según semana de edad (ANOVA). | 123  |
| <b>Anexo 8.</b> Resultados del Software Stata SE 10.1 para: a) la comparación sanos y enfermos para IL4 (T de Student), b) Prueba de Tukey para identificar grupos etarios estadísticamente distintos dentro de los sanos.  | 125  |

## I. INTRODUCCIÓN

Los camélidos sudamericanos (CSA) son parte importante de la economía de subsistencia de los pobladores altoandinos. De los CSA, la alpaca es la más utilizada debido a su carne y fibra. La mayoría de la población de estos animales se ubica en las zonas altoandinas de Puno, administradas a través de pequeños productores.

Uno de los mayores factores de impacto económico es la alta mortalidad y morbilidad de las crías de alpaca a causa de microorganismos patógenos que afectan el sistema respiratorio y el tracto digestivo, principalmente enterotoxemia, neumonía y colibacilosis. Estos problemas sanitarios afectan principalmente a animales menores de 3 meses de edad. Esta situación no sólo tiene impacto económico sino que impide el crecimiento sostenido de la actividad alpaquera al disminuir la producción neta de animales, por ende menor cantidad de animales que contribuyan con la variabilidad genética total de la región.

Gracias al desarrollo de técnicas moleculares se han hecho grandes avances en cuanto al secuenciamiento de genes involucrados con la respuesta inmune tanto en dromedarios (*Camelus dromedarius*) como en llamas (*Lama pacos*) y ha sido posible evaluar en estas especies ciertos aspectos de la respuesta inmune a nivel sistémico.

En nuestro medio, hay pocos estudios específicos relacionados con inmunidad de mucosa en crías de alpaca. Tales estudios son imprescindibles para elucidar los mecanismos inmunes que suceden tras la invasión de patógenos y permitir la generación de alternativas terapéuticas y preventivas que se valgan de estos mecanismos para mejorarlos, prolongarlos e incluso abolirlos a fin de mejorar las respuestas inmunes y eliminar eficientemente tales patógenos.

El presente estudio se enfoca en la inmunidad adquirida (respuesta celular y humoral) en mucosa intestinal de crías de alpaca como línea base para la descripción de la cinética normal del desarrollo inmune en esta población animal susceptible y también cambios dinámicos observables en animales con cuadros de enteropatía cursando con diarrea activa. Para tal fin, se han empleado varias

herramientas moleculares cuya utilidad ha sido comprobada en dromedarios y llamas, como medios fiables y certeros de cuantificación de estas respuestas.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Camélidos Sudamericanos: la alpaca

Las alpacas son miembros de la familia *Camelidae*, suborden *Tylopoda*, orden *Artiodactyla*, clase Mamífero. Los animales de la familia *Camelidae* son importantes en la puna de los Andes de Sudamérica y en el desierto extremadamente árido de Gobi, donde juegan un rol importante en la vida de los pobladores. Los camélidos en general son rústicos y menos susceptibles a infecciones que afectan a otro tipo de ganado como la brucelosis y la tripanosomiasis. También ha podido detectarse el virus de Aftosa, aunque no se han reportado casos naturales de la enfermedad. Recientemente, se ha clonado una gran variedad de citoquinas en especies de interés veterinario como la llama (*Lama pacos*) (Odbileg y col., 2006).

Estudios hechos a través de ADN mitocondrial y microsatélites han sugerido fuertemente la descendencia de las alpacas (*Vicugna pacos*) a partir de las vicuñas (*Vicugna vicugna*). Tanto el guanaco como la vicuña parecen haber descendido de un ancestro común y sufrieron divergencia hace alrededor de 2 millones de años; por su parte, las alpacas pudieron haberse separado de las vicuñas hace unos 6 o 7 mil años (Kadwell y col., 2001).

#### 2.1.2. Aspectos sanitarios e inmunes en camélidos

Se han encontrado varios patógenos comprometiendo la sanidad de las alpacas. Entre éstos, los descubrimientos más tempranos se refieren a *Brucella sp.* De las seis especies conocidas de *Brucella sp.*, se sabe que *Brucella abortus* y *Brucella mellitensis* son las que causan abortos de forma más frecuente en camélidos. Se ha encontrado que los dromedarios (*Camelus dromedarius*) presentan títulos de anticuerpos contra ambos tipos de bacteria y al menos *B. mellitensis* ha sido aislada de los nódulos linfoides supramamarios en animales sin signos clínicos evidentes (Hegazy y col., 2004).

La hematología de los animales infectados por *B.abortus* denota anemia no regenerativa, normocítica, normocrómica (atribuibles a niveles séricos elevados de IL-1 $\beta$ ) además de linfopenia y cambios bioquímicos como elevación de las enzimas SD, ALT y AST. En general, *B. abortus* causa más cambios patológicos en camellos que *B. mellitensis* (El- Boshy y col., 2009).

Las especies domésticas de Camélidos Sudamericanos (CSA) presentan las mayores tasas de morbilidad y mortalidad en edad de cría (Martin, 2010), incluyendo este período la mortalidad perinatal (0-7 días de edad), la mortalidad neonatal (hasta los 30 días de edad) y mortalidad de crías mayores de un mes hasta el destete (hasta los 6 a 8 meses de edad) (Rosadio, 2010). Ameghino y De Martini (1991), realizaron un estudio en los departamentos de Puno y Junín, evidenciando que las muertes se concentran en la etapa neonatal, siendo críticos los primeros 30 días de edad.

Una característica biológica determinante en la aparición de cuadros infeccioso en crías de alpaca, es que estas nacen hipogammaglobulinémicas debido a la placentación epiteliocorial difusa de los camélidos (Cid, 2010) y absorben las inmunoglobulinas (principalmente IgG) del calostro ingerido (Ramírez y col., 1998). La falla en la transferencia pasiva de inmunoglobulinas presentes en el calostro ha sido asociada a la mortalidad de crías (Garmendia y col, 1987); es así que se debe garantizar una adecuada toma de calostro en las primeras 24 horas de vida, tiempo a partir del cual la absorción del mismo disminuye en eficacia (Cid y Martín, 2010).

Recientemente, se han publicado reportes de infecciones entéricas en crías de camélidos sudamericanos. Se han detectado patógenos como *Salmonella sp.*, *Clostridium perfringens*, Rotavirus, Coronavirus, y ciertos parásitos como *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium spp.* Los patógenos potenciales que suelen cursar con diarrea en camélidos sudamericanos menores de 7 meses de edad incluyen coronavirus (42%), *Giardia spp* (18%), *Eimeria spp* (13%),

*Cryptosporidium spp* (9%), rotavirus (2%) y nemátodos (2%) (Genova y col., 2008).

La enterotoxemia afecta principalmente a crías de entre 2 y 3 semanas de edad, periodo crítico en el cual los animales debieran ser protegidos por anticuerpos maternos, por lo que resultaría beneficioso la aplicación de vacunas a las madres gestantes a pesar de la reticencia de los criadores a manipular a este grupo de animales. La presentación cíclica de la enfermedad asociada a aumento de precipitación pluvial se relaciona con efecto de inmunidad en masa debido a infecciones naturales, que permiten la transmisión de anticuerpos hacia las nuevas generaciones por un periodo de tiempo tras el cual, al decaer la cantidad y calidad de estos anticuerpos, las nuevas crías quedan susceptibles a la infección (Yaya y Rosadio, 2005).

Similarmente a lo que ocurre en aves, la infección previa con protozoarios del grupo *Eimeria sp.* seguida de infección por *Clostridium perfringens* suelen causar enteritis necróticas en ambas especies. La naturaleza oportunista de *C.perfringens* le ha permitido beneficiarse de la producción excesiva de moco en aves pre infectadas con *Eimeria sp.*, teniendo en cuenta que esta bacteria utiliza el moco como substrato y que la producción de moco es parte del mecanismo inmune para la eliminación de parásitos protozoarios. Se ha observado que la IL-4 e IFN- $\gamma$  tienen expresión elevada durante la primera fase de la infección (Collier y col., 2008).

La enfermedad está causada por toxinas del *Clostridium perfringens* estando implicado en el Perú principalmente el tipo A y sólo en algunos casos el tipo C (Maturrano y col, 2010). Se trata de un bacilo anaeróbico esporulado (Ramírez y col, 1998) capaz de producir potentes toxinas (Fernández-Baca, 2005) en el lumen intestinal provocando alteración de la permeabilidad de la pared intestinal y resultando en acumulación de fluidos y electrolitos dentro del lumen, así como la absorción de toxinas al torrente sanguíneo (Ramírez y col, 1998).

Generalmente los animales que mueren por enterotoxemia se encuentran en buenas condiciones cárnicas. Externamente se observa el abdomen hinchado, por la presencia de gas en los intestinos y al abrirlo desprende un olor desagradable característico. Los intestinos suelen estar congestionados y a veces hemorrágicos. Es frecuente encontrar a lo largo de los intestinos, inflamación de las placas de Peyer. Los ganglios mesentéricos suelen estar aumentados de tamaño, congestionados o hemorrágicos. La mucosa del estómago glandular puede estar congestionada o hemorrágica. El hígado está congestionado y a veces amarillento, signo de degeneración grasa. Los pulmones pueden estar congestionados y edematosos. Todas estas alteraciones son compatibles con un cuadro septicémico (Fowler, 1998; Ameghino y De Martini, 1991; Ramírez y col, 1998). Histopatológicamente, la lesión más común encontrada en el intestino delgado, tanto en duodeno, yeyuno e íleon, es la enteritis necrótica (Palacios y col, 2005).

Desde el punto de vista comercial, en aves de consumo se producen cuadros de enteritis necrótica debido al cese del uso de antibióticos como promotores del crecimiento, lo que ha promovido la replicación masiva de estas bacterias en el intestino delgado de los animales. También tiene efecto sobre salud pública ya que carne contaminada con esta bacteria genera intoxicación alimentaria caracterizada por dolor abdominal y diarrea profusa, en este caso la tercera de mayor importancia a nivel mundial. En broilers se logra controlar la infección por *C. perfringens*, la producción de  $\alpha$ -toxina y el daño causado por enteritis necrótica mediante el uso de bacitracina, esto ha sido demostrado a través de cuantificación de ARNm bacteriano. El progreso de la enfermedad alcanza su pico a los dos días post infección y empieza a declinar a partir de los 4 días. La respuesta inmune contra este patógeno en aves abarca tanto la respuesta celular como humoral a través de la regulación aumentada de transcritos de genes relacionados a moléculas MHC-I y MHC-II así como a CD45, adicionalmente hay niveles séricos aumentados de IgG e IgA. Contrariamente, se ha observado que transcritos de ARNm de genes relacionados a procesos de apoptosis (caspasas 8 y 9) se encuentran disminuidas lo que indica inhibición de apoptosis



en las fases tempranas de infección por *C.perfringens* en broilers (Zhou y col., 2009).

Por sí misma, la infección por coccidias se caracteriza por presentar respuesta inflamatoria que conlleva a aumento de agua y moco en el material fecal, constituyendo la diarrea. Es un escenario complejo al involucrar fases extra e intracelulares, donde el resultado final es la ruptura celular gracias a la expansión de este patógeno. A nivel inmune, la infección coccidial se caracteriza por el aumento de la expresión de IL-10 como mecanismo de supresión de inmunidad celular a fin de evadir la destrucción mediada por macrófagos, con la consiguiente supresión de IFN- $\gamma$  (Collier y col., 2008).

En alpacas, dentro de las coccidias se ha reportado a las especies de *Eimeria* como una de las causas principales de mortalidad en crías de alpaca. Se han descrito 5 especies que afectan tanto a la alpaca como a la llama, éstas son *Eimeria alpaca*, *E. lamae* y *E. punoensis* (que infectan el epitelio intestinal), *E. macusaniensis* (que afecta las criptas intestinales) y *E. ivitaensis* cuya patogenicidad aún es desconocida, aunque se encuentra restringida al yeyuno e íleon. Estos últimos suelen causar edema, engrosamiento del tejido intestinal, pérdida de tejido, acortamiento y fusión de vellosidades intestinales. Suelen observarse cuadros de necrosis, hiperplasia e hipertrofia de vellosidades intestinales con infiltración abundante de células mononucleares y neutrófilos. Es posible observar distintos estadios parasitarios en las células infectadas e incluso es posible la coinfección con especies distintas. Se ha reportado la asociación *E. macusaniensis* y *E. lamae* como la asociación más patógena; aunque evidencia actual y antigua (momias de llamas ubicadas en la región de Chiribaya, Perú) indican asociación entre *E. macusaniensis* y *E. ivitaensis* de características altamente patógenas (Palacios y col., 2006).

En nuestro medio, Rosadio y col (2010) demostraron que el 30% de crías de alpaca tienen formas sexuales y asexuales de *E. macusaniensis*, la que suele causar enteritis necrotizante o hemorrágica en tracto intestinal.

Un estudio reciente sobre el perfil de expresión de citoquinas en intestino delgado de broilers infectadas primero con *Eimeria maxima* y luego con *C. perfringens* demostraron regulación negativa de IL-2, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  e IL-16 en los días 1 y 2 tras infección con *C. perfringens* (Park y col. 2008). No se han hecho estudios tan detallados en CSA debido a la poca factibilidad de emplear animales en experimentos relacionados a la infección por *C. perfringens* o al estudio *in situ* de la inmunidad entérica.

Por otro lado, estudios empleando microarreglos en bazo de broilers infectados únicamente con *C. perfringens* demostraron regulación positiva tardía de genes relacionados a MHC-I y II, CD8 y CD45; y regulación negativa de genes relacionados a apoptosis (caspasas 8 y 9) a partir de los dos días post infección. Tales diferencias se atribuyen a la regulación negativa directa del resultado de la interacción bacteriana con el sistema inmune local a diferencia de una respuesta sistémica (ya que muchas células de origen intestinal habrán ingresado en el bazo) cuyo fin es promover la supervivencia de células del sistema inmune inhibiendo procesos apoptóticos para defender al organismo de la infección (Zhou y col., 2009).

La toxina- $\alpha$  de *Clostridium perfringens* está involucrada en la liberación de mediadores proinflamatorios y de la respuesta inmune celular. Stevens (2000) reportaron que tal efecto es indirecto al promover la liberación de IL-8 y el Factor Activador de Plaquetas. Antibióticos macrólidos como la eritromicina logran atenuar los efectos de la toxina- $\alpha$ , incluyendo la hemólisis y muerte en ratones inoculados experimentalmente (Oda y col., 2008). Históricamente, esta toxina ha sido considerada como la responsable de la presentación de enteritis necrótica en pollos de engorde. Sin embargo, el reciente descubrimiento de la toxina NetB y su rol crítico para la presentación de enteritis necrótica en pollos broilers ha desvirtuado este antecedente (Keyburn y col., 2009).

Estudios hechos en mamíferos y aves señalan que las respuestas iniciales contra este patógeno radican en la sobre expresión de la familia TLR2 y en menor

grado de TLR4, tal cual ocurre con muchas bacterias gran positivas (Tietze y col., 2006).

En el Perú, se ha genotipificado y subtipificado aislamientos de *C. perfringens* obtenidos de 47 casos clínicos de enterotoxemia en crías de alpaca, diagnosticados por signos clínicos, lesiones histopatológicas y aislamiento bacteriano. Se encontró que el 70.2% de estos aislamientos correspondieron al genotipo A ( $cpe^-$ ,  $cpb2^-$ ), el 27.7% correspondió al genotipo A subtipo  $cpe^-$   $cpb2^+$  y el 2.1% fue del subtipo  $cpe^+$   $cpb2^+$ . Este estudio ha demostrado la predominancia del genotipo A en nuestro territorio (Pérez, 2006).

En otras especies de camélidos sudamericanos, se ha logrado aislar una cepa de *E.coli* serotipo O26:H11 productora de shigatoxina (STEC) a partir de un guanaco de dos meses de edad con cuadro clínico severo de diarrea acuosa. Las colonias bacterianas aisladas exhibían genes para las toxinas *stxI* (shigatoxina 1) y *eae* (codificante de la proteína intimina, responsable de la fuerte adhesión y lesión a los enterocitos), adherencia a células HEp-2 y produjeron enterohemolisina A (Mercado y col., 2004).

Infecciones virales como las ocasionadas por pestivirus también han sido reportadas en alpacas. Particularmente, está bien definida la infección por el virus de la diarrea viral bovina, donde incluso se ha reportado la infección experimental de células de alpaca in vitro. Aún más importante, se ha logrado identificar crías de alpaca persistentemente infectadas por este virus al presentar antígeno y genoma viral en múltiples tejidos (identificados a través de RT-PCR y aislamiento viral) en ausencia de anticuerpos neutralizantes. Es de notar que los aislamientos fueron posibles en tejido como piel y tracto gastrointestinal, lugares no habituales del virus en especies rumiantes, lo que indicaría nuevas rutas de infección y fisiopatología en esta especie (Byers y col., 2009).

En el año 2008 en California, logró detectarse ARN del virus de Lengua Azul en una alpaca hembra de 15 años de edad que falleció luego de exhibir signos

clínicos tales como recumbencia, dificultad respiratoria y debilidad generalizada (Ortega y col., 2010).

Se ha logrado aislar Coronavirus grupo 2 en alpacas adultas con signos clínicos de diarrea, anorexia y pérdida de peso. Tal diagnóstico se realizó mediante inmunohistoquímica sobre tejido intestinal. Aparentemente este tipo de infecciones suele presentarse en animales bajo estrés nutricional y su detección ha sido posible en el extranjero. Se observó también que este tipo de infección entérica parece estar dispersándose rápidamente alrededor del mundo, afectando no sólo a las crías neonatas y juveniles sino que también a animales adultos (Genova y col., 2008).

También se ha reportado el Virus del Oeste Nilo (West Nile Virus) en una alpaca en el estado de Minnesota en Estados Unidos, presentando signos nerviosos y lesión histopatológica caracterizada por tortícolis, hieroestesia, ataxia, recumbencia, y alteración general de la respuesta nerviosa con mortalidad al tercer día del inicio de los signos (Yaeger y col., 2004).

Las alpacas poseen características del sistema inmune muy particulares, como por ejemplo la existencia de anticuerpos IgG carentes de cadena ligera. Estos anticuerpos carecen además del dominio CH1 y tienen regiones de complementaridad (segmentos CDR3) más largos para compensar la falta de cadenas ligeras. Se ha postulado que estos anticuerpos cumplen funciones tan importantes como los anticuerpos convencionales e incluso tienen cualidades tales como la inhibición de enzimas y mayor accesibilidad a antígenos debido a su menor tamaño. Aún falta dilucidar su rol en la transferencia de inmunidad pasiva y actividades en animales neonatos (Daley-Bauer y col., 2010).

Recientemente, se ha clonado una gran variedad de citoquinas en especies de interés veterinario como la llama y el camello bactriano empleando oligonucleótidos diseñados sobre secuencias de bovinos publicadas online. Se ha encontrado que para el camello bactriano, los ADNc de las citoquinas de la respuesta Th1 como IL-2, IL12 e IFN- $\gamma$  tienen longitudes de 465, 669 y 501pb,

respectivamente, con marcos abiertos de lectura que codifican 154, 222 y 166 aminoácidos, respectivamente. Por otro lado, los ADNc de las citoquinas de la respuesta Th2 como IL-4, IL-10 e IL-13 tienen una longitud de 402, 537 y 411 pb codificando secuencias de 133, 178 y 136 aminoácidos, respectivamente. Para todas las citoquinas, se observó gran homología entre las secuencias de llama y camello, muy por encima de la similitud encontrada con la vaca, conservando sitios de glicosilación y residuos de cisteína lo que implica segmentos altamente conservados de citoquinas entre las distintas especies y probablemente funciones y regulación similares. Es de particular importancia el estudio de la respuesta inmune tipo Th2 debido a la existencia única de anticuerpos libres de cadenas ligeras, que existen únicamente en los camélidos (Odbileg y col., 2006).

Se ha empleado la técnica de RT-PCR Tiempo real para cuantificar con éxito el ADN de citoquinas de importancia en camellos del viejo mundo, especialmente las citoquinas derivadas de tejidos y células individuales y en camellos bactrianos vacunados con *Brucella abortus* S19 (vacuna viva atenuada). Este estudio demostró la presencia de anticuerpos contra la vacuna una semana post inoculación, siendo el título más alto a las dos semanas post vacunación. Los niveles de expresión de ARNm de las citoquinas IFN $\gamma$ , IL-6, IL-1, TNF $\alpha$ , IL-10 de los camellos vacunados fueron tan altos como 6.5, 4.1, 2.1, 2.0, 1.9 y 2.7 veces los niveles de los controles no vacunados, respectivamente. Los mayores niveles de expresión de IFN $\gamma$  e IL-6 se hallaron dos semanas después de la aplicación de la vacuna. Por otra parte, los niveles de IL-2 siempre fueron bajos en los vacunados, al igual que los niveles de IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-10. No fue posible detectar IL-4 en el grupo de los animales vacunados. El papel de IL-10 no sería el convencional, donde hace balance entre Th1 y Th2, sino más bien limitaría los efectos de reacciones inflamatorias provocadas durante la patofisiología de la enfermedad. Este estudio concluyó que *B. abortus* S19 promueve una respuesta eminentemente tipo Th1 y una pobre respuesta Th2 (Odbileg y col., 2008).

Sobre los camélidos sudamericanos, se ha clonado y secuenciado las citoquinas IFN $\gamma$ , IL-2, IL12p35 e IL12p40 obteniéndose cDNA de 501, 465, 669 y 993pb de longitud con marcos de lectura abierto codificando 166, 154, 22 y 330 aminoácidos, respectivamente. El análisis filogenético revela relación cercana con las secuencias de mamífero del orden Artiodactyla como el cerdo y el bovino, de manera similar a lo encontrado en el camello bactriano (Odbileg y col., 2004).

Además, se ha clonado y secuenciado el cDNA de las citoquinas de la respuesta Th2 como IL-4, IL-10 e IL-13 empleando los mismos oligonucleótidos diseñados en secuencias de bovinos. Se obtuvieron productos con longitudes de 402, 537 y 411 pb con marcos abiertos de lectura de 133, 178 y 136 aminoácidos, respectivamente (casi idéntico a lo encontrado en el camello bactriano). Análisis filogenéticos señalan relaciones cercanas con los mamíferos del orden *Artiodactyla* (cerdo y bovino) y *Perissodactyla* (caballo), con valores similares a los encontrados en el camello bactriano (Odbileg y col., 2005).

Actualmente, existen vacunas a base de anacultivos de *C.perfringens* cuya eficiencia ha sido evaluada a través de estudios prospectivos. Estas vacunas parecen ser eficaces administradas únicamente a las madres gestantes, las crías o a ambas, observándose una mejor tendencia en los programas que incluyen a las madres (Yaya y Rosadio, 2005).

## **2.2. Inmunidad de mucosa intestinal**

Las superficies mucosas están conformadas por barreras de células epiteliales que limitan el entorno de los microorganismos patógenos y los tejidos del hospedero (Eckmann y col., 1993). Es la superficie corporal más amplia en contacto con el ambiente externo donde los microorganismos patógenos suelen hacer uso de la señalización y moléculas celulares. En el primer paso, algunos microorganismos se adhieren inicialmente al borde en cepillo de las células intestinales para aprovecharse de esta maquinaria de comunicación mientras

otros han evolucionado para producir factores de virulencia, reorganizar el citoesqueleto celular e incluso promover la formación de vacuolas para generar espacios adecuados que favorezcan su supervivencia tras la adhesión inicial. Acto seguido, estos microorganismos invaden el tejido subyacente a la barrera intestinal. La inmunidad adaptativa se observa típicamente a los 4 o 7 días post infección. A diferencia del epitelio respiratorio, el epitelio intestinal tolera la colonización de bacterias comensales exhibiendo una mínima reacción inflamatoria a estas bacterias o a sus productos. Como parte del sistema inmune innato, adicionalmente a la barrera conformada por la línea de enterocitos que componen la mayor parte del epitelio, se encuentran también células de Goblet (productoras de mucina) y células de Paneth (las que producen péptidos antimicrobianos) que son parte de la inmunidad innata (Liévin-Le Moal y Servin, 2006).

Por ende, el epitelio intestinal es una barrera que facilita la absorción de nutrientes mientras limita el ingreso de material antigénico o nocivo desde el lumen intestinal. La lámina propia, ubicada inmediatamente debajo del epitelio intestinal, está poblada por células del sistema inmune capaces de contrarrestar el ingreso de estos materiales (Berin y col., 1999).

El intestino está habitado por un complejo y dinámico ecosistema bacteriano, los mamíferos coexisten con un estimado de 300-500 especies de bacterias comensales que colonizan el hábitat intestinal (Guarner, 2007). Inmunológicamente, cuando el intestino de mamíferos es colonizado por nuevas especies bacterianas tras el nacimiento, aumenta el número de células plasmáticas a lo largo del intestino, la producción de anticuerpos circulantes específicos y naturales antibacterianos, se estimula la producción en los centros germinales de las placas de Peyer de células B antígeno-específicas (Cebra y col., 1998) y promueve la maduración y acumulación de linfocitos en el epitelio asociado a las placas de Peyer (Yamanaka y col., 2003).

Indudablemente, los enterocitos son un componente crítico en el sistema inmune de mucosas ya que representan una barrera primaria entre el hospedero y

antígenos ambientales. Estas células pueden reconocer patógenos a través de receptores del sistema inmune innato, responder mediante la liberación de péptidos antimicrobianos y modular los eventos iniciales de la respuesta inmune adquirida mediante secreción de mediadores pro y anti inflamatorios y citoquinas (Pastorelli y col., 2010).

Las células epiteliales intestinales están activamente involucradas en la regulación de los eventos de inflamación intestinal, habiéndose observado en ratones deficientes de IL-2 el aumento de expresión de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 después de iniciarse eventos de colitis. Estas células pueden presentar antígenos a través del MHC-II y secretar activamente las citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 e IL-6 y la proteína atrayente de monocitos o MCP-1, citoquinas marcadoras de inflamación inespecífica. El LPS (lipopolisacárido) de la pared bacteriana de las gram negativas es un componente común a muchas bacterias y funciona como un potente estímulo local para la producción de estas citoquinas e IL-8. Sin embargo, los ratones normales no expresan niveles detectables de estos transcritos, los que son detectables sólo en ratones mayores de 24 semanas de edad con colitis (Meijssen y col., 1998).

Se encuentra gran cantidad de células presentadoras de antígenos como células dendríticas (DC) en la lámina propia, por debajo de la barrera entérica, o intraluminalmente a medida que extienden sus procesos hacia el lumen para “sensar” el medio intestinal. De la gran cantidad de TLR’s presentes en estas células, se ha demostrado que existe mayor proporción de TLR4 en células dendríticas de la lámina propia colónica, sin desmedro del resto de TLR’s o sus funciones. Este el mecanismo inicial para el reconocimiento de patógenos a nivel intestinal (Rathinam y col., 2009). Los macrófagos y miofibroblastos también producen TLR’s, recientemente se ha observado que células endoteliales también sintetizan TLR4 y 5, confiriéndoles un papel en la inmunidad innata de mucosas (Heidemann y col., 2007)

Distintas células leucocitarias se encuentran distribuidas a lo largo de la lámina propia, incluyendo células dendríticas, macrófagos y linfocitos B y T (LPL-



Linfocitos de la Lámina Propia). Los linfocitos T son predominantemente TCR  $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en el caso de humanos y ratones. También se encuentran en la lámina propia células plasmáticas productoras de IgA, aunque también de IgG e IgM. Los macrófagos y células dendríticas de la lámina propia estarían involucrados en la presentación de antígeno *in situ* (Guy-Grand y col., 2003). En la mucosa del yeyuno, existe aproximadamente un 85 % de linfocitos intra-epiteliales (IELs) CD8<sup>+</sup>. Tanto en controles como en ensayos los IELs CD8<sup>+</sup> (90 %) predominan sobre los CD4<sup>+</sup> (8 %). En linfocitos de lamina propia (LPL) esta proporción se invierte a favor de los CD4<sup>+</sup> (60% vs 40%) (Selby y col., 1983).

Se desconoce la etiología de muchas enfermedades inflamatorias intestinales, y la gran mayoría de enfermedades son de carácter infeccioso, es aceptado que el desbalance de las citoquinas del sistema inmune juegan un rol importante en el desarrollo de las lesiones intestinales, independientemente de la etiología de la enfermedad (Cominelli, 2004).

Aunque la deficiencia de leptina se ha asociado a resistencia a enfermedad en modelos de autoinmunidad e inflamación inducida por estímulos exógenos, parece que su papel en la presentación de colitis espontánea en animales deficientes de IL-10 no es significativo; aunque sí parece tener un rol importante en la supervivencia de linfocitos. Estos efectos se relacionarían a protección de Células T contra la apoptosis, modulación de activación y proliferación de células T, fagocitosis por macrófagos y expresión de moléculas de adhesión. De tal forma, la deficiencia de leptina causaría efectos con patrones distintos dependiendo del tipo de estímulo aplicado a causa de la producción disminuida de ciertas citoquinas (dependiendo del estímulo empleado) pero sus efectos son no significativos en procesos de enfermedades autoinmunes (Siegmund y col., 2004).

Varios estudios han sugerido que una respuesta específica de citoquinas frente a determinado patógeno no es necesariamente la mejor vía para la resolución de la infección causada por otro patógeno, llevando a duración prolongada del cuadro. Esto se debe a que los distintos factores de virulencia y patogenicidad

estimulan respuestas inmunes distintas y por ende tienen resolución distinta (Long y col., 2010).

Por ejemplo, se ha demostrado que niveles altos de TNF- $\alpha$  e IL-6 se asocian a duración disminuida de los cuadros diarreicos causados por cepas de *E.coli* tipo EPEC (enteropatógenicas), probablemente debido a que ambas citoquinas activan mecanismos efectores a nivel de epitelio intestinal. Por otro lado, el aumento de IL-8 tiende a causar daño extremo en el tejido intestinal tras promover la migración de neutrófilos. Asimismo, los niveles elevados de IL-4 y no de IFN- $\gamma$  ayudan a eliminar la infección por EPEC, demostrando que la respuesta Th1 no puede por sí misma erradicar las infecciones entéricas. Es de remarcar que muchos mecanismos de evasión de patotipos de *E.coli* se valen de regular negativamente la expresión de citoquinas (Long y col., 2010).

La toxina A de *C.difficile* (kDa) ha sido empleada en modelos murinos para evaluar los efectos de los mediadores proinflamatorios a nivel intestinal. Se ha observado que además de causar disfunción severa de los enterocitos y sus uniones intercelulares, es un potente atrayente de polimorfonucleares (PMN) cuyos mediadores causan inflamación y necrosis entérica. Tal daño es controlado esencialmente por corticosteroides endógenos, cuya ausencia causada por adrenalectomía promueve la muerte de ratones inoculados con Toxina A directamente en las asas intestinales ileales (Castagliuolo y col., 2001).

Otros patógenos modulan la respuesta inmune entérica promoviendo la apoptosis de células del sistema inmune a manera de mecanismo de patogenicidad. *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* y *Yersinia enterocolitica* estimulan apoptosis de macrófagos entéricos dependientemente de sus sistemas de secreción tipo III (comunes entre las bacterias Gram negativas). De esta forma, las proteínas tipo III de *S. typhimurium* y *S.flexneri* activan la Caspasa 1 causando apoptosis de macrófagos y liberación de citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ ; mientras que *Y.enterocolitica* inhibe la señalización a través de NF- $\kappa$ B provocando apoptosis y supresión de la respuesta inflamatoria. En contraste, *C.jejuni* promueve apoptosis y liberación

de IL-1 $\beta$ a través de mecanismos distintos a los previamente descritos, valiéndose de gran variedad de proteínas antigénicas (*Cia*) y factores aún no determinados (Siegesmund y col., 2004).

Un nuevo enfoque de interés son las células enteroendocrinas (EEC) las que se encuentran dispersas y solitarias, ubicándose en las criptas y las vellosidades intestinales, representando el 1% de todos los enterocitos presentes en el tejido intestinal. Su función principal es la de sensor el medio luminal, particularmente en busca de nutrientes, y junto a las células de Goblet y de Paneth constituyen las células entéricas secretoras, mientras que 90% del epitelio sano es eminentemente absorptivo. La vida media de este linaje es de 4-6 días, mostrando gran plasticidad y capacidad de reposición rápida como parte de un sistema endocrino antiguo. Estudios recientes denotan un rol potencial de estas células en la regulación del sistema inmune de mucosa intestinal, y son de particular interés en el estudio de enfermedades como Síndrome de Colon Irritable, enfermedad inflamatoria entérica y enfermedades infecciosas entéricas. En líneas celulares, se ha demostrado mediante inmunohistoquímica la expresión de proteínas TLR, mediadores proinflamatorios como TNF- $\alpha$  y mediadores anti inflamatorios como TGF- $\beta$  (Moran y col., 2008).

Moléculas producidas por estas células parecen tener un papel importante en la inmunidad de mucosas. El péptido CCK tiene efecto inmunomodulador al aumentar la translocación de IgA hacia el lumen y linfa. La proteína GLP-2 (péptido glucagón-2) participa de la reparación celular en presencia de TGF- $\beta$ , particularmente en intestino delgado. De esta forma, se considera que la privación de alimento que afecta directamente a esta población de células, podría predisponer a respuestas inmunes disminuidas frente a agentes infecciosos y condiciones inflamatorias. En animales, se ha demostrado que parásitos como *Ascaris suum*, *Trichostrongylus colubriformis* y *Trichinella spiralis* promueven la proliferación de células EEC a través de comunicación linfocitos T CD4 (+), lo que genera disminución del apetito y pérdida de peso aunados a los efectos de los parásitos en sí (Moran y col., 2008).

### **2.2.1. Respuesta inmune: modulación a través de citoquinas**

En general, el efecto neto de cualquier citoquina depende del tiempo que dura la liberación de la citoquina, el ambiente local donde actúa, la presencia de elementos sinérgicos o competidores, densidad de sus receptores y capacidad de respuesta del tejido a la citoquina. La inhibición mutua entre las respuestas tipo Th1 y Th2 polarizan el tipo de respuesta final frente a un patógeno determinado, siendo la regulación de las células T a partir de citoquinas anti inflamatorias un evento crucial en esta diferenciación (Opal y Depalo, 2000).

Sin embargo, y a pesar del paradigma Th1-Th2, se han ido hallando otros subtipos de células T CD4<sup>+</sup> como poblaciones de células Th1 que producen IL-10 e IFN- $\gamma$  simultáneamente, rompiendo el esquema clásico y demostrando la plasticidad de las células que conforman el sistema inmune. El análisis de citoquinas in vivo es extremadamente difícil, debido a su secreción y dispersión rápida, y su producción en baja cantidad, por lo que el uso de métodos tales como el aislamiento de células y re-estimulación in vitro ha sido necesario. Contrariamente, el uso de estos métodos tiende a perder las condiciones microambientales normales dando lugar a perfiles de expresión génica alterados. Por este motivo, se implementó el uso de modelos murinos genéticamente modificados, “reporteros bicistrónicos” que proveen información de lo que ocurre in vivo (Kalies y col., 2008).

Los linfocitos T de memoria son subpoblaciones de estas células que logran memorizar la expresión de moléculas efectoras como las citoquinas, en particular aquellas que le han sido instruidas para expresar durante su activación primaria. La expresión es transitoria, durante un evento de re-exposición al mismo antígeno (Tykocinski y col., 2005).

En términos generales, se ha evidenciado transcripción de citoquinas de la respuesta Th1 (IFN- $\gamma$ ) y Th2 (IL-10) en modelos murinos a nivel basal en tejido linfóide durante estados de reposo y no activación. Estos niveles basales se asocian a zonas específicas de células T o B. Tras exposición directa a antígenos

sanguíneos en bazo se observan cambios en la transcripción del ARNm de las mencionadas citoquinas. Estos cambios son rápidos, transitorios, limitados al compartimento linfoide, y preceden la proliferación celular, aunque la transcripción de citoquinas tiene lugar dentro de las 72 horas post inoculación de antígenos derivados de sangre (Kalies y col., 2008). La capacidad de producción de citoquinas es variable entre individuos y depende de polimorfismos génicos (Budak y col., 2007). En el caso de voluntarios humanos, se observó que tras la inyección de endotoxinas los niveles de TNF- $\alpha$  alcanzan su pico sérico tras una hora, seguido de cerca de IL-1 $\beta$ , IL-6 a las 3 horas post inoculación e IL-10 a las 5 horas post inoculación (Fleming y col., 2003).

Específicamente, se han hecho esfuerzos por elucidar patrones inmunes en tejido intestinal de rumiantes infectados con agentes patógenos de importancia clínica. De este modo, se ha observado que existen patrones inmunes y patológicos distintos entre diferentes especies animales, tal cual ocurre durante la infección con *M. avium* subespecie *paratuberculosis*. En este caso, se ha demostrado correlación positiva fuerte entre la severidad de la enfermedad, la población de linfocitos CD8 circulantes y la expresión de ARNm de IL4 en tejido intestinal (Gillan y col., 2010).

De manera convencional, las citoquinas juegan parte primordial en determinar una respuesta inmune de tipo protectora. Se han logrado grandes avances en el estudio de las respuestas (o firmas) de citoquinas ante una variedad de agentes infecciosos, así como su rol en la regulación y contracción de las respuestas inflamatorias. Los Linfocitos T helper (Th) se subdividen en Linfocitos Th1 y Th2 de acuerdo al patrón de citoquinas que sintetizan. La susceptibilidad o resistencia a ciertas infecciones está ligada íntimamente con la expresión particular de patrones de citoquinas. El análisis de estos perfiles permite clarificar las propiedades funcionales de las células del sistema inmune, tanto para investigación como para diagnóstico clínico (Odbileg y col., 2008).

Odbileg y colaboradores (2006) lograron clonar, secuenciar y analizar el ADNc de los genes de las citoquinas de respuesta Th1 (IL-2, IL-12p35 e IFN- $\gamma$ ) y Th2

(IL-4, IL-10 and IL-13) del camello bactriano (*Camelus bactrianus*) y la llama (*Lama pacos*). Se encontró que estas citoquinas tienen 465, 402, 537, 669, 411, y 501 pb de longitud con marcos de lectura abiertos (ORF) codificando 154, 133, 178, 222, 136, y 166 aminoácidos, respectivamente. La homología de las secuencias nucleotídicas se ubica entre 58.8 a 100% frente a las secuencias publicadas para otros mamíferos, incluyendo la llama, cerdo, vaca, caballo, humano y ratón. El ADNc tuvo la homología más alta con los miembros del orden *Artiodactyla* (porcinos y vacunos) y *Perissodactyla* (equinos), y especialmente con las secuencias de llama (*Lama pacos*) obtenidas por los mismos autores. Esto fue posible empleando oligonucleótidos diseñados para las secuencias publicadas en vacunos.

En estudios serológicos hechos en dromedarios (*Camelus dromedarius*), se encontró elevación de la expresión de IL-1 $\beta$  e IL-10 en animales infectados con *Brucella abortus* y *B. mellitensis*. Notablemente, la expresión de IL-1 $\beta$  fue mayor en aquellos animales infectados con *B. abortus*. Por otro lado, los niveles de citoquinas de la respuesta Th1 (celular) como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  e IFN- $\gamma$  mostraron disminución marcada de la expresión, mientras que la IL-6 no mostró diferencias en expresión entre animales infectados y no infectados (El-Boshy y col., 2009).

Convencionalmente, las citoquinas han sido clasificadas de acuerdo al tipo de respuesta inmune que son capaces de promover en conjunto. Se clasifican en:

#### **a. Citoquinas de respuesta tipo Th1**

Son producidas para estimular la respuesta celular para combatir patógenos invasivos intracelulares (Opal y Depalo, 2000). La polarización hacia este tipo de células depende del estímulo de IL-12, el que a través de STAT4 activa el factor de transcripción Tbet que es característico de la respuesta Th1 al promover la síntesis de las interleucinas propias de esta población. A su vez, Tbet induce la producción de IFN- $\gamma$ , lo que aumenta gracias a la IL-2 producida por otras células T activadas (Boyman y Sprent, 2012).

- **IFN- $\gamma$**

Esta citoquina se produce mayormente en células NK y linfocitos Th1 activados, tiene efectos múltiples sobre las mismas NK, macrófagos y linfocitos T. Además, varios estudios señalan un rol en procesos inflamatorios agudos debido a su influencia en la migración de neutrófilos y macrófagos, por lo que frecuentemente se le clasifica dentro de las citoquinas proinflamatorias. Sin embargo, tales estudios han demostrado actividad anti inflamatoria durante procesos de pancreatitis aguda provocada por inyección de ceruleína en ratones. Tal actividad se atribuye a la acetilación del factor Stat 1 (una de las principales señales traductoras) que a su vez inhibe la activación de NF- $\kappa$ B. Este último promueve la transcripción de factores proinflamatorios como TNF- $\alpha$  e incluso COX-2 (Hayashi y col, 2007).

Los interferones representan una de las primeras líneas de defensa frente a infecciones virales. Su actividad es ejercida a través de la inducción de genes estimulados por IFN (ISGs). Estos mediadores ejercen múltiples funciones que interfieren en varios pasos del proceso de replicación viral, aunque se desconoce los mecanismos precisos de tales actividades, se sabe que estos procesos son simultáneos y constan de pasos que además de complementarse tienden a sobreponerse unos sobre otros (Stirnweiss y col., 2010).

Durante infección natural por *B.abortus* en dromedarios se ha observado su disminución marcada debido tal vez a la actividad inhibitoria de IL-10. Este mecanismo pudiera ser responsable de la falla de la respuesta inmune celular en infecciones crónicas por *Brucella sp.* en humanos y animales (El-Boshy y col., 2007). Se produce excesivamente durante deficiencia de Vitamina A (o su metabolito Retinol) en perjuicio de la respuesta humoral debido a desbalance de las células T Helper existiendo función excesiva de Th1 y deficiente de Th2 (Iwata y col., 2004).

Su expresión alcanza su máximo a las 24 horas post inoculación de antígenos derivados de sangre en tejido linfoide de bazo de ratón, donde se circunscribe a la zona correspondiente a Linfocitos T. A las 72 horas, la producción de ARNm

decae, acompañando el momento máximo de proliferación de células T (Kalies y col., 2008).

Esta citoquina tiene efectos pleiotrópicos y diversos como regulación positiva de la expresión de moléculas MHC, inducción de la formación del complejo inmunoproteosoma e inducción de una variedad de moléculas efectoras antimicrobianas en macrófagos y otras células, lo que principalmente mejora la actividad antimicrobiana. Por otro lado, posee a su vez propiedades antiinflamatorias a través de la inducción del supresor de señal de citoquinas 1. Asimismo, tiene efectos significativos sobre la proliferación y diferenciación de linfocitos T. Por tanto, su producción es crítica para la eliminación de virus y diversos organismos intracelulares como bacterias y parásitos protozoarios; así como para la respuesta frente a microorganismos menos estudiados como protozoarios del género *Cryptosporidia*, *Microsporidia* y *Entamoeba histolytica*, algunos de los cuales afectan el tracto digestivo de varias especies de mamíferos incluyendo al hombre (Lykens y col., 2010).

En ovejas infectadas con *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* se ha demostrado la participación necesaria de IFN- $\gamma$  para promover una correcta respuesta inmune donde coexistan las respuestas celulares y las respuestas humorales, primordialmente en ovejas infectadas pero asintomáticas y en la versión paucibacilar de la enfermedad (Gillan y col., 2009).

Se han ensayado aplicaciones biomédicas para las versiones sintéticas y derivadas de cultivos celulares para esta citoquina, particularmente en casos de infección crónica por *Mycobacterium* y en pacientes con presentación de tumores. Aunque es bien tolerada en pacientes humanos con diversos tumores o hepatitis virales, su toxicidad es dependiente de dosis, además de tener sendos efectos secundarios (Hayashi y col., 2007).



- **TNF- $\alpha$**

En los mamíferos, esta citoquina pertenece al grupo de las citoquinas activadas a través de NF- $\kappa$ B que estimulan las respuestas sistémicas (Lu y col., 2009). Junto a IL1 e IL6 participan como mediadores principales de la inmunidad natural contra bacterias Gram negativas y son mediadores clave de las respuestas inflamatorias y el shock séptico. Como parte de la respuesta inmune celular, esta citoquina es necesaria como coestimulador para la producción de IFN $\gamma$  (Odbileg y col., 2008).

El daño que produce en los tejidos durante procesos sépticos o inflamatorios se debe a su actividad sobre la respuesta de los neutrófilos en la producción y liberación de elastasa, ión superóxido, peróxido de hidrógeno, leucotrieno B1, factor activador de plaquetas (PAF) y tromboxano A2, los que en conjunto generan el escenario de inflamación con la consiguiente remodelación del tejido afectado (Aldridge, 2002).

La actividad de esta citoquina parece ser inhibida por antibióticos macrólidos como la eritromicina que al ser administrada previamente a la  $\alpha$  toxina de *C. perfringens* logra disminuir la liberación de esta citoquina y mejorar la producción de citoquinas de la respuesta Th1 como IFN- $\gamma$  e IL-2 y de la respuesta Th2 como IL-4, mejorando la tasa de supervivencia en ratones. Tal efecto se atribuye a la inhibición de la fosforilación del TrkA mediado por toxina- $\alpha$  de *C. perfringens*, lo que impediría la liberación de TNF- $\alpha$  (Oda y col., 2008).

Se han hecho grandes progresos en relación a las enfermedades inflamatorias intestinales, donde se vienen practicando terapias que involucran el bloqueo activo de TNF- $\alpha$  e IL-1 con gran éxito en la supresión de signos clínicos de enteritis, particularmente en el caso de colitis ulcerativa en humanos (Rutgeerts y col., 2009). Por otra parte, esta citoquina ha sido asociada a cáncer de colon junto a IL-6 (Koller y col., 2010); mientras que su deficiencia en ratones infectados con *Mycobacterium avium* promueve la diseminación de estas

bacterias y la aparición de focos granulomatosos múltiples y en lugares distantes al foco de infección primaria (Coussens, 2004).

- **IL-1  $\alpha$**

Esta citoquina parece tener roles duales al promover la polarización de la respuesta inmune hacia Th1 y funcionar como un factor nuclear intracelular (Werman y col., 2004). Adicionalmente, esta citoquina puede ser liberada por células estresadas o dañadas como una señal de peligro (alarmina) para alertar al sistema inmune de un posible daño (Pastorelli y col., 2010).

La expresión de esta citoquina es independiente del NF- $\kappa$ B, reflejando los múltiples estímulos y rutas capaces de inducir estas respuestas (Jones y col., 2003). Comparte muchas de las actividades biológicas de TNF- $\alpha$ , y estimula la síntesis y liberación de prostaglandinas, elastasas, colagenasas, provocando la liberación de IL-8 y PAF que son potentes activadores de los neutrófilos (Oda y col., 2008).

Se ha demostrado un papel primordial en la lucha contra infección de *M. paratuberculosis* en experimentos empleando anticuerpos monoclonales contra el receptor de esta citoquina. Los ratones control fueron más eficientes eliminando la infección en hígado e íleon gracias a la participación de IL-1 en la iniciación de la respuesta inmune celular (Kennefick y col., 1994).

- **IL-1  $\beta$**

Esta citoquina es sintetizada como un precursor de 31kDa que es escindida a su forma madura (secretada) de 17kDa por la Caspasa-1. Su liberación en caso de enteritis por *C.jejuni* se atribuye a la Caspasa-1, la que se encarga de su síntesis, procesamiento y liberación 3 horas después de inoculación con esta bacteria (Siegesmund y col., 2004).

Actualmente, se sabe de su función en la inmunidad innata al aumentar la expresión de moléculas de adhesión endoteliales para favorecer la migración de leucocitos y macrófagos hacia los sitios de infección. Esta función es de vital importancia en el proceso inflamatorio de los hospederos y el primer paso de la inmunidad adquirida al favorecer la presentación de antígenos (El- Boshy y col., 2007). Sin embargo, niveles elevados en sangre contribuyen a la generación de anemia no regenerativa normocítica normocrómica asociada a enfermedad crónica (Dinarello, 2005).

Adicionalmente, se ha observado que la sobre expresión de esta citoquina puede estar relacionada con el Síndrome de Muerte Súbita que se presenta en infantes ya que interfiere con los procesos de resucitación como ha sido probado en lechones (Froen y col., 2000). Junto a su agonista  $TNF\alpha$  actúa como adyuvante en la producción de anticuerpos, se le ha asociado a enfermedades autoinmunes y a una elevada producción de anticuerpos a través de polimorfismos en el gen  $IL1\beta$  (Astermark y col., 2006)

- **IL-2**

Su función principal radica en la expansión in vivo de linfocitos; aunque adicionalmente participa de la contracción de respuestas inflamatorias, programación de linfocitos para iniciar la apoptosis y crecimiento y supervivencia de Linfocitos T reguladores (T reg). Estas funciones adicionales se correlacionan con la expresión de cofactores como Blimp1 (Martins y col., 2008). La fuente de esta proteína son otras células T (incluyendo linfocitos T autoreactivos), constituyendo un feedback negativo regulatorio cuya ausencia promueve el desencadenamiento de enfermedades autoinmunes como gastritis, tiroiditis, neuropatía severa y diabetes tipo 1 que suelen prevenirse tras la administración de IL-2 exógena (Setoguchi y col., 2005).

En condiciones normales, esta citoquina es producida principalmente por linfocitos T  $CD4+$  en órganos linfoides secundarios y, en menor extensión por células  $CD8+$  (luego de la activación por antígeno) y células NK (natural killer o

asesinas naturales). Sólo en determinadas condiciones puede ser producida en bajas cantidades por células dendríticas activadas y mastocitos. Su síntesis consta de varios mecanismos regulatorios incluyendo silenciamiento de su gen codificante a través del factor de transcripción BLIMP1, el cual es activado por el mismo IL-2 y que en respuesta suprime la síntesis proteica de esta citoquina proveyendo de un mecanismo de regulación de retroalimentación negativa. Las células T efectoras que se han convertido en células de memoria central expresan niveles bajos de BLIMP1 lo que les permite mantener niveles adecuados de IL-2. Sin embargo, la exposición prolongada a antígenos (incluyendo los autoantígenos) promueve nuevamente la producción de BLIMP1 lo que reduce su capacidad de producir IL-2 a medida que se diferencian terminalmente o se agotan. Tal estímulo también puede derivar en la expresión de ligandos de muerte promoviendo la apoptosis de estas células durante el mecanismo de tolerancia central y periférica (Boyman y Sprent, 2012).

Para ejercer su actividad, las células deben expresar el receptor IL2R de alta afinidad (trimérico) o el de baja afinidad (dimérico) dependiendo de la coexistencia de las cadenas  $\alpha$  (CD25),  $\beta$  (CD122) y  $\gamma_c$ , siendo funcionales en la señalización las cadenas  $\beta$  y  $\gamma$  (expresadas en niveles bajos pero significativos en células CD8<sup>+</sup> vírgenes y CD4<sup>+</sup> de memoria, y en altas cantidades en células CD8<sup>+</sup> de memoria y células NK). La cadena  $\alpha$  participa de la afinidad por el ligando (expresada de manera transitoria y en niveles elevados en células CD4 y CD8<sup>+</sup> luego de su activación a través de su TCR) cuya expresión está regulada por STAT5. Estudios en humanos han demostrado que IL-2 se une primeramente a CD25 con alta afinidad, lo que promueve un cambio estructural en IL-2 el cual luego es capaz de unirse a CD122 y  $\gamma_c$ , el complejo es rápidamente internalizado y el trímero IL-2-CD122-  $\gamma_c$  es subsecuentemente degradado para que CD25 regresa a la superficie celular para ser reutilizado. CD122 y  $\gamma_c$  son los componentes de señalización al poseer motivos señalizadores en sus colas intracitoplasmáticas. La señalización tiene varias vías como la vía JAK-STAT, PI3K-AKT y la vía MAPK (Boyman y Sprent, 2012).

Su actividad sobre las células CD8 se realiza sobre expansión primaria, contracción, generación de memoria y expansión secundaria, actuando esencialmente de manera autocrina o de forma paracrina a través de células T CD4<sup>+</sup> tras su activación a través de células dendríticas presentadoras de antígeno. Asimismo, la duración del estímulo de IL-2 determina el destino de aquellos linfocitos que son estimulados, de modo que aquella población de linfocitos T que expresan cantidades bajas de CD25 por periodos cortos terminan favoreciendo la expresión de IL7R para que se diferencien en células T de memoria. Por otro lado, aquella subpoblación que expresa altas cantidades de CD25 en superficie por uno o dos días tras la exposición al antígeno son muy sensibles a IL-2 lo que determina su diferenciación en células CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> efectoras de corta vida (Boyman y Sprent, 2012).

La señal de IL-2 regula positivamente la expresión de CD25 y amplifica la capacidad supresora de las células Treg al mantener niveles altos de expresión de FOXP3, aunque por sí mismas estas células no pueden producir grandes cantidades de IL-2 sino que dependen de su actividad paracrina. En ausencia de IL-2, además de disminuir la cantidad de células Treg, se produce aumento de células Th17 lo que incrementa la presentación de enfermedades autoinmunes y procesos inflamatorios. En las células Th2, IL2 induce la expresión temprana de IL4R $\alpha$  y mantiene accesible la configuración del locus de IL4 durante las últimas fases de diferenciación hacia Th2. Aún más, IL-2 influye sobre la accesibilidad del locus de IL-13 en células Th2. Por tanto la eficiencia en la expresión de IL-2 influye drásticamente en el destino de las células T activadas ya que niveles sub óptimos de IL2 impiden una correcta respuesta primaria y secundaria. En células presentadoras de antígeno, se cree que serviría para la presentación en forma *trans* de IL15 e IL2 a células T específicas, de modo que células dendríticas activadas expresarían CD25 en sus superficie (Boyman y Sprent, 2012).

El IL-2R $\beta$  es componente del IL-15R, mientras que  $\gamma_c$  es una subunidad de IL-4R, IL-7R, IL-9R, IL-15R e IL-21R. Se considera por tanto que IL2 es el factor de crecimiento más importante de linfocitos T recientemente y específicamente activados por antígenos, expandiendo su número significativamente. Además de

esta función, la presencia masiva de IL-2 sensibiliza a los linfocitos T que están en pleno crecimiento y maduración para que ingresen en procesos de apoptosis o muerte celular inducida por activación (AICD, siglas en inglés) ante una segunda estimulación a través de su TCR (Malek y col., 2002).

Adicionalmente, esta proteína es crucial para el mantenimiento de la auto tolerancia inmunológica, siendo crítica para la diferenciación, mantenimiento y supervivencia de células T reguladoras adaptativas (A-Treg) a través de la inducción de expresión del gen FoxP3 como mecanismo de control de la inflamación. Tal mecanismo de regulación es crucial en la inmunidad de mucosa intestinal en vista de los procesos inflamatorios provocados por estímulos masivos y constantes de las bacterias comensales intestinales y los antígenos alimentarios. Esta regulación puede ser estimulada empleando ácido retinoico e incluso sus derivados y requiere a su vez de la participación de TGF- $\beta$  (Benson y col., 2007).

Los mecanismos a través de los cuales ejerce esta función regulatoria tienen lugar durante y después del desarrollo fetal, durante los procesos de selección negativa en la tolerancia central tímica y durante la vida normal del individuo. Se ha encontrado que existe gran cantidad de células T que expresan niveles altos de transcritos de IL2 a nivel de la región cortico medular, un sitio tímico clave para la selección y maduración de células T. Favoreciendo este hallazgo, se ha demostrado que células CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>, timocitos intermedios de transición, expresan las 3 subunidades de IL-2R (Malek y col., 2002). El mecanismo por el cual ejerce su efecto en el desarrollo de estas células reguladoras se relaciona a la capacidad de las células regulatorias para suprimir la transcripción de ARNm de IL-2 en sus células blanco, impidiendo a los linfocitos T responder al estímulo proliferativo del mismo IL-2 (Thornton y col., 2004).

Los ratones deficientes en IL-2 suelen tener mortalidad del 50% entre la cuarta y sexta semana de edad a causa de anemia hemolítica autoinmune, los animales

que sobreviven desarrollan enfermedad inflamatoria intestinal histológicamente similar a las lesiones observadas en colitis ulcerativa en humanos. Estas lesiones se caracterizan por presentar elongación de las criptas y proliferación de células epiteliales entéricas, depleción de células de Goblet, abscesos ocasionales en criptas y presencia de células inflamatorias en mucosa (Meijssen y col., 1998).

Los niveles de IL-2 varían considerablemente en modelos murinos, dependiendo de los tipos celulares que los producen y lo consumen. En reposo, los niveles más altos son producidos por células T CD4<sup>+</sup> con niveles intermedios de CD25, seguidos de CD4<sup>+</sup> CD25<sup>low</sup>, CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup>, células NK y Células T CD8<sup>+</sup>. Notablemente, tanto las células T con TCR $\gamma\delta$  como TCR $\alpha\beta$  producen cantidades elevadas de IL-2. Inmediatamente después de la activación linfocitaria, los niveles de expresión de IL-2 aumentan rápidamente y por varios días en órganos linfoides secundarios donde es consumido por linfocitos CD4, CD8 y Treg (Boyman y Sprent, 2012).

En células T CD4 (+) vírgenes el locus codificante de IL-2 se mantiene en estado transcripcionalmente silente hasta la presentación de antígenos hacia su TCR, en el contexto de la existencia de una molécula MHC apropiada y señales coestimuladoras. Una región regulatoria mínima esencial se localiza en un segmento de 300pb antes del sitio de inicio de la transcripción. En este lugar, miembros de las familias NF- $\kappa$ B, AP-1 y NFAT interactúan para modular la transcripción del gen. Se han observado cambios en la estructura de la cromatina que acompañan la inducción de la transcripción de IL-2. Se ha identificado un tipo de regulación bifásica de la transcripción de esta citoquina, donde la fase tardía (hasta 18 horas posteriores a la presentación de antígeno) depende de cRel, CD28 y TNFR mientras que la fase temprana (hasta 6 horas posteriores a la presentación de antígeno) depende sólo parcialmente de las primeras dos moléculas y es independiente de TNFR. Esto junto a la reorganización de la cromatina permitiría la producción rápida de IL-2 durante reto secundario (McKarns y Schwartz, 2008).

De esta manera el locus de IL-2 permanece en un lugar genómico donde la estructura de la cromatina impide que se una a sus factores transcripcionales y los mecanismos anteriormente descritos promoverían el remodelamiento de la cromatina en los sitios promotores y reguladores del locus de modo que estos sitios queden “abiertos” o “disponibles” para tales factores de transcripción. Para tal efecto, son necesarias las señales coestimuladoras de CD28 tras la formación del complejo TCR-Ag ya que sin ellas se producen los eventos de anergia clonal que forman parte del mecanismo de tolerancia periférica (Thomas y col., 2007).

Este tipo de mecanismo ha sido estudiado en ratones, donde a través de la técnica de precipitación de cromatina (chIP) se ha identificado acetilación de las histonas H3-H4 y demetilación de la histona H3 en la posición Lys-4 (H3/H4) en exón 1 del gen IL-2 en células de linaje T competentes de ratón. La acetilación H3/H4 se ha observado en células que se encuentran transcribiendo activamente el gen, mientras que la demetilación H3/H4 se observa particularmente durante el estado silente de la célula T. Esta regulación epigenética se mantendría para estos genes que deben permanecer silentes por periodos largos de tiempo ya que su expresión es temporal para regresar a un estado de “off” tan pronto desaparece el estímulo (Adachi y Rothenberg, 2005).

Tal acetilación es dependiente de enzimas acetiltransferasas, las que inhiben la compactación del nucleosoma y generan sitios de unión para enzimas dependientes de ATP remodeladoras de cromatina. Tal efecto es de importancia durante el desarrollo de células T en Timo, donde son seleccionadas y forzadas hacia anergia clonal dependiente de factores como *Ikaros*, el cual es sensible al bloqueo de IL2R y CD28 (Thomas y col., 2007).

En estudios hechos en ratones inoculados vía intravenosa con antígenos derivados de sangre, se ha observado que la producción de ARNm de IL-2 toma lugar de manera gradual entre las 9 y 24 horas post exposición. Similarmente a lo observado para IFN- $\gamma$ , la producción de ARNm está reservada para la zona de células T en pulpa blanca de bazo murino y decae a las 72 horas post



inoculación para acompañar el máximo índice de proliferación linfoide (Kalies y col., 2011).

Como inmunoterapia, se ha demostrado que la infusión de altas dosis de IL-2 es útil para la proliferación de células T y NK antitumorales con aumento de tiempo de supervivencia en casos de melanoma metastásico o carcinoma renal, e incluso se le ha empleado como agente “booster” en infecciones virales crónicas como VIH. Sin embargo, su vida corta, efectos tóxicos severos y la estimulación preferente de células Treg han impedido su difusión como agente terapéutico.

#### **b. Citoquinas de respuesta tipo Th2**

Son secretadas por linfocitos Th2 y representan una gran variedad de citoquinas anti inflamatorias como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 para combatir principalmente a patógenos extracelulares a través de la inmunidad humoral. La expresión de estas citoquinas depende de dos eventos moleculares íntimamente ligados, estos eventos son la expresión de factores de transcripción específicos de linaje y modificación epigenética del loci de los genes de citoquinas. GATA-3 es un factor de transcripción crítico para estos genes y su expresión ectópica en células Th activadas induce la expresión de estas citoquinas aún en células Th1. Evidentemente, este factor se encuentra sobre regulado en el linaje Th2 debido a la presencia del factor Stat6 o al mismo factor GATA-3 cumpliendo una función autoregulatoria (Tykocinski y col., 2005).

Este tipo de células regulan las respuestas inflamatorias mediadas a nivel humoral y celular contra helmintos, toxinas y otras moléculas solubles extrañas. En individuos con cierta predisposición genética, tales células promueven las reacciones alérgicas contra células animales, polen y contaminantes (Huber y col., 2010).

- **IL-4**

Es una citoquina de 20KDa producida por células Th2 maduras (Linfocitos T activados), mastocitos, Linfocitos B y células estromales para promover el desarrollo de los linfocitos Th2 y la inhibición de la síntesis de citoquinas proinflamatorias inducidas por LPS. Es una citoquina altamente pleiotrópica cuya producción temprana lleva a la diferenciación hacia células Th2, las que la producen de manera autocrina favoreciendo su propia diferenciación. Su producción inhibe la diferenciación de las células Th1 al regular de manera negativa la producción de IL-12 a partir de macrófagos. Asimismo, sirve como mediador del reclutamiento y activación de mastocitos y estimula la producción de Inmunoglobulina E (IgE) vía diferenciación de linfocitos B hacia plasmocitos productores de IgE. Se ha demostrado que es capaz de bloquear o suprimir a las citoquinas derivadas de macrófagos como IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8, suprime también la actividad citotóxica de los macrófagos, muerte de parásitos intracelulares, y producción de óxido nítrico. Desde el punto de vista infeccioso, aún no es clara su participación en la eliminación de patógenos, por el contrario, funciona como un factor de crecimiento para *Staphylococcus aureus* facilitando su diseminación sistémica. Por otro lado, afecta células estructurales promoviendo la proliferación del endotelio vascular y fibroblastos cutáneos, aunque disminuye la proliferación de astrocitos y músculo liso vascular. Adicionalmente, algunos estudios señalan una posible actividad anti tumoral (cáncer pulmonar) con carácter dosis dependiente (Opal y De Palo, 2000).

Otra función importante es la activación de macrófagos al inducirlos al estado “M2” conocido como el fenotipo activado. Esta actividad refleja el carácter contradictorio de la citoquina, dependiente de dosis, tiempo y célula blanco (Koller y col., 2010).

La señal instructiva de IL-4 induce la diferenciación de linfocitos Th vírgenes activados hacia células Th2 expresando IL-4, IL-5 e IL-13. Durante el desarrollo de los linfocitos Th2, el gen IL-4 permanece demetilado y su cromatina se

acetila, quedando eucromático, contrario a lo que ocurre en células Th1 polarizadas donde permanece heterocromático. Adicionalmente, la sobreexpresión de GATA3 induce los sitios hipersensibles II, III y V dependientes de DNAsa I e hiperacetilación del locus IL-4 como modificaciones epigenéticas adicionales para establecer memoria en células Th2 polarizadas. Participa directamente sobre la regulación al ligarse a un elemento en el intrón 1 del gen IL-4, proceso que resulta crucial para el mantenimiento de la memoria. Este elemento (CIRE) consta de una región dentro del exón 1 de 17pb de longitud bien conservadas entre los mamíferos, esta secuencia corta contiene 2 sitios de unión a GATA-3 (Tykocinski y col., 2005).

Su señalización se realiza mediante la unión de IL4 a la cadena  $\alpha$  de su receptor (IL4R  $\alpha$ ) y su consecuente dimerización con la cadena gamma común (complejo tipo I) o con la cadena IL13R $\alpha$ 1 (complejo tipo II). Este último es idéntico al formado por IL13 y la cadena IL13R $\alpha$ 1 con subsecuente dimerización con IL4R $\alpha$ , así que tanto IL4 como IL13 son ligandos para IL4R; aunque se ha sugerido que IL4 es el ligando de preferencia. Es de notar que IL4R $\alpha$  promueve el crecimiento de tumores en ratones inoculados con agentes cancerígenos químicos, por lo que esta molécula pudiera ser considerada como blanco terapéutico (Koller y col., 2010).

La regulación de la transcripción sigue las vías NFAT y AP-1 a través de influjos de  $\text{Ca}^{2+}$  que modulan la fosforilación de estos factores de transcripción. Recientemente, se ha demostrado que ionóforos tipo ionomicina, que promueven el ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelularmente, regulan la producción de citoquinas favoreciendo la producción de IL-4 a través de la defosforilación de NFAT, activación de ASK1 que lleva a la síntesis del factor p38 y la inducción de la síntesis de AP-1 (factor de transcripción), estando estos tres eventos íntimamente ligados. Asimismo, el factor de transcripción p38 estabiliza la vida media del ARNm de IL-4 (Guo y col., 2008). Inicialmente claro, el IL-4R promueve el reclutamiento y fosforilación del factor STAT6, el que finalmente regula la inducción de la transcripción del factor GATA-3. En ausencia de IL-4, GATA 3 es capaz de regular positivamente su propia expresión manteniendo la

estabilidad de la respuesta Th2. El IFN-I ( $\alpha/\beta$ ) puede bloquear la expresión de GATA-3, desestabilizando el fenotipo Th2, lo que lo hace candidato como agente terapéutico en enfermedades de tipo alérgico; aunque tal función adicional para IFN I ha sido demostrada sólo en humanos (Huber y col., 2010).

A diferencia del resto de citoquinas, no se ha demostrado que exista correlación positiva significativa entre los niveles de ARNm de IL-4 y la expresión final de la proteína (Kalies y col., 2011). Tal efecto es particularmente notable en líneas celulares de cáncer de colon, donde la variabilidad en la expresión proteica es mayor que la variabilidad observada en los transcritos de IL-4, sugiriendo la síntesis de formas solubles de la proteína (Koller y col, 2010).

Se han descrito polimorfismos en el gen codificante de IL4, como por ejemplo un SNP (single nucleotide polymorphism) en la posición 590 de la región promotora que se asocia a atopía, desórdenes alérgicos, condiciones inflamatorias y autoinmunes (Astermark y col., 2006).

Estudios en la línea celular derivada de enterocitos humanos (línea T84) inoculada con IL-4 exógena y suero de pacientes atópicos ha demostrado el traslado bidireccional de moléculas con tamaño y composición antigénica desde el borde apical hacia el borde basal entérico, con aumento de expresión de IL-4. Esta condición es un factor predisponente para la inflamación al permitir que antígenos lumenales sean interiorizados y adquieran acceso al sistema inmune. Existe una asociación importante entre la expresión de esta citoquina y las alergias atópicas, tanto en humanos como en modelos animales. Otros efectos directos sobre la mucosa intestinal incluyen, además del aumento de permeabilidad apical-basal, reducción de respuestas secretoria iónica, disminución de la resistencia eléctrica, cambio de clase para favorecer la producción de IgE, estimulación de producción de otras citoquinas propias de la respuesta Th2, aumento de expresión ante la presencia de helmintos. Interesantemente, su producción siempre está relacionada a mucosas, un lugar ideal para modificar el funcionamiento de las células que componen tales barreras (Berin y col., 1999)

Similarmente a lo que ocurre en vías respiratorias, esta citoquina ha de tener efecto sobre metaplasia de células Goblet e hipersecreción de mucus en el epitelio intestinal (Reader y col., 2003). La respuesta Th2 a través de la expresión de IL-4 parece tener un efecto protector contra infecciones entéricas por ETEC, tal vez debido a la necesidad de producción de IgA para eliminar tal infección e incluso es crucial para la resolución de la infección por *G. lamblia*. Sin embargo, la respuesta tipo Th1 es esencial para disminuir la carga de trofozoitos y quistes de este parásito a nivel intestinal (Long y col., 2010). Asimismo, se le ha involucrado con los mecanismos patogénicos del asma, alergias y atopias (Koller y col., 2010).

- **IL-10**

Se trata de una citoquina anti inflamatoria que encontrándose en niveles altos puede resultar en infección entérica prolongada (Long y col., 2010).

Es producida por monocitos/macrófagos, linfocitos Th2 y linfocitos B, inhibe la producción de las citoquinas IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-8 e IL-12 de los monocitos/macrófagos y neutrófilos y la respuesta de los linfocitos Th1. Circula en forma de homodímero que consiste de dos proteínas de 160 aminoácidos. Inhibe la expresión de moléculas MHC-II, moléculas accesorias tipo B7 y la proteína CD14 en la superficie celular. También inhibe la síntesis de citoquinas en neutrófilos y células NK, inhibe la translocación nuclear del NF- $\kappa$ B y promueve la degradación del ARN mensajero (ARNm) de las citoquinas proinflamatorias. Por otro lado, atenúa la expresión del receptor de TNF y promueve su desprendimiento hacia la circulación. Puede medirse durante las infecciones sistémicas y en estados inflamatorios, por lo que su administración durante endotoxemias ha resultado en mejoramiento de la supervivencia en modelos animales gracias a menor efecto sistémico de las citoquinas (Opal y De Palo, 2000).

Tiene efecto inhibitorio autocrino sobre macrófagos y células dendríticas, limita las funciones innatas de estas células, impidiendo la activación subsecuente de células T. Por otro lado, aumenta la expresión de sí misma en células T reguladoras, promoviendo su propia síntesis en un sistema de retroalimentación positivo que limita la respuesta inmune. Dentro de los mecanismos de regulación destaca la participación de moléculas agonistas de TLR2 en células presentadoras de antígeno donde se encuentran PAMP's, estas moléculas son cruciales para la síntesis de IL-2 en macrófagos y células dendríticas, aunque las células plasmacitoides no producen IL-10. Luego de que una molécula se ha ligado al TLR, es necesaria la participación de moléculas adaptadoras como MYD88 (MAPK y NFκB) y TRIF. Es de notar que la inducción óptima de IL-10 desde antígenos tipo LPS requieren la participación de ambas vías de señalización además de requerir moléculas accesorias como IFN I. Parte de su regulación depende también de la expresión de IL-6 que induce la expresión de IL-21 y que finalmente de manera autocrina promueve la expresión de IL-10 según lo hallado en células dendríticas de médula ósea estimuladas con LPS in vitro (Maynard y col., 2009).

Su importancia en la resolución de cuadros entéricos sintomáticos causados por cepas *E.coli* EPEC es notoria debido a que disminuye los efectos destructivos de las citoquinas proinflamatorias, las que se encuentran elevadas en pacientes sintomáticos (Long y col., 2010). Actualmente, su uso viene siendo evaluado como terapia en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal (Opal y De Palo, 2000).

Ratones deficientes de esta citoquina presentan colitis espontánea o inflamación intestinal crónica, la que es mediada por células T CD4+ y se asocia a respuestas Th1 incrementadas en la fase temprana de la enfermedad, mientras que las citoquinas de la respuesta Th2 aparecen tardíamente (Siegmund y col., 2004). Contrariamente, su deficiencia en modelos murinos infectados experimentalmente con *Mycobacterium avium* son capaces de controlar mejor la infección que su contraparte no manipulada. Lo contrario ocurre con ratones

deficientes en IL4, los que exhiben signos patológicos más graves que los animales normales (Coussens, 2004).

En los análisis filogenéticos efectuados sobre secuencias de llama y camello, se ha demostrado que la secuencia de ADNc de IL-10 se relaciona estrechamente con las secuencias del caballo (*Perissodactyla*), humano (*primates*), bovino (suborden *Ruminantia*) y porcino (suborden *Suiformes*) (Odbileg y col., 2006).

En infecciones naturales con *B. abortus* y *B. mellitensis*, se ha demostrado la elevación de los niveles de IL-10 en suero de dromedarios (*Camelus dromedarius*), esto probablemente se deba a un mecanismo de evasión de la respuesta inmune que modula la transcripción y expresión de IL-10 para suprimir la respuesta celular (Th1) contra esta bacteria (Erdogan y col., 2007).

En modelos humanos y murinos, se ha comprobado que existe diferencia en la producción de IL-10 entre el sexo masculino y femenino, siendo los machos los que expresan niveles más bajos de IL-10 mientras que las hembras tienden a mostrar mejor recuperación tras procesos inflamatorios (Asai y col., 2001).

En inoculaciones experimentales de modelos murinos con antígenos sanguíneos se ha observado el aumento de producción de su ARNm en 25 y 3 veces en la zona marginal y la zona de linfocitos B de folículos linfoides de la pulpa blanca de bazo a la hora post inoculación. Este evento inesperado pudiera explicarse por la presencia de linfocitos B pre-activados en la zona marginal de folículos linfoides, capaces de producir IL-10 para inducir la expresión de receptores de quimocinas (Kalies y col., 2011).

Similarmente a lo observado con TGF- $\beta$ , IL-10 también contribuye a la generación de células T reguladoras (Treg), aunque en menor grado que TGF- $\beta$ , como ha sido demostrado en cultivo celular de al menos 2 generaciones de estas células supresoras. La actividad de ambas citoquinas se ha evaluado a través de la cuantificación del ARNm y su adición en cultivos celulares donde su actividad puede ser bloqueada con anticuerpos monoclonales específicos. Esta

nueva generación de células Treg implica la “educación” de células CD4+CD25- para que adquieran actividad supresora dependiente de IL10 y TGF- $\beta$ , lo que representa un sistema de regulación de respuesta frente a autoantígenos o antígenos presentados por APC en mucosa intestinal (Zheng y col., 2004).

Aún más, forma parte de la firma citoquímica de las células T reg e incluso es característica de las células T reguladoras tipo 1 (Tr1, que no expresan Foxp3), aunque sólo las T reg residentes en mucosa intestinal son competentes para coexpresar IL-10 a manera de mecanismo de tolerancia periférica contra antígenos intestinales. Este sistema funcionaría a través de TLR's, limitando su respuesta contra antígenos de microorganismos comensales (Maynard y col., 2009).

Se han descrito varios polimorfismos para esta citoquina asociados a enfermedades de corte autoinmune en pacientes humanos, por ejemplo, una variante de 134pb de un microsatélite en la región promotora del gen IL10 que se asocia a concentraciones altas de inmunoglobulinas en enfermedades como lupus eritematoso sistémico, miastenia gravis, y granulomatosis de Wegener (Astermark y col., 2006).

Estudios hechos en humanos han demostrado que existe un origen genético para la producción aumentada de IL10 que es de carácter clínicamente significativo. Así por ejemplo, se ha demostrado que existen diferencias marcadas entre individuos sanos para producir IL10 tras la estimulación con LPS y grupos familiares caracterizados por sobreproducir esta citoquina teniendo mayor probabilidad de sucumbir ante un episodio de enfermedad por meningococos. El origen genético de estas diferencias explica entre el 50 y el 70% de las variaciones inter individuo, en el caso de los humanos se han descrito 11 polimorfismos y dos microsatélites solamente en la región promotora del gen, lo que ha determinado la existencia de cuatro haplotipos comunes de IL10. Estas variaciones se han asociado a la presentación de enfermedades autoinmunes y la resolución de determinadas patologías, y se explican por variaciones alélicas y mecanismos regulatorios post transcripcionales (Kurreeman y col., 2004).



En efecto, la mayoría de estudios realizados en rumiantes sobre inmunidad de mucosas contra agentes intracelulares como *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* han demostrado una clara diferenciación entre la inmunidad de mucosas local (gobernada por respuestas humorales caracterizadas por producción de IgA e IL-6) e inmunidad sistémica. Tales diferencias radican en los fenotipos de los linfocitos presentes en tales situaciones; por ejemplo, los linfocitos T en epitelio intestinal del íleon tienen una menor capacidad expansiva o de respuesta a estímulos proliferativos. Existen patrones de expresión de ARNm elevados en vacas con enfermedad subclínica de Johne donde se expresan niveles elevados de las citoquinas IL-1, IL-6, IL-10 y TGFβ, en comparación con animales sanos (Weiss, Evanson y Souza, 2006).

- **TGF-β**

Es una citoquina inmunoreguladora cuya función principal es la de inhibir la proliferación y diferenciación de linfocitos T y otros leucocitos. A su vez, induce la producción de IgA y el cambio de clase hacia este isotipo en linfocitos B. Se trata de un grupo de proteínas codificadas por genes distintos que pertenecen a una misma familia (β1, β2 y β3), siendo la molécula β1 producida principalmente por células del sistema inmune (linfocitos T activados por antígeno y fagocitos mononucleares) en forma de homodímero que debe ser escindido para convertirse en la proteína madura (Abbas, 2003).

En inmunología y fisiología, se han hecho grandes avances en el estudio de ambos componentes de la respuesta inmune en humanos y roedores (los que sirven de modelo para el estudio de los primeros), haciendo posible el uso de herramientas eficientes y específicas. Sin embargo, se ha avanzado lentamente en el estudio de la respuesta inmune en los animales domésticos con fines de producción o mejoramiento sanitario. Con la llegada de técnicas moleculares como el RT-PCR ha sido posible detectar y cuantificar la expresión de citoquinas con fines de investigación y aplicativos en estas especies animales. Teniendo en cuenta que la información genética que codifica las citoquinas del

sistema inmune se encuentra bastante conservada entre distintas especies, esto ha hecho posible el diseño de oligonucleótidos específicos a partir de secuencias conservadas de tales genes en especies distintas (Rottman y Tompkins, 1996).

### **III. MATERIALES Y METODOS**

#### **3.1. Animales y muestras:**

Los animales fueron obtenidos de la Estación Experimental IVITA-Maranganí y de zonas aledañas a la estación.

Se emplearon dos grupos de crías de alpaca de recién nacido a 45 días de edad, un grupo de animales sanos y un grupo de animales enfermos con enteropatía (diarrea al momento del muestreo), distribuidos en los siguientes grupos etarios, considerando al menos 5 animales por grupo y sin hacer distinción por sexo o variedad:

Grupo cero: recién nacido (0 días de edad)

Grupo 1: de 1 a 7 días

Grupo 2: de 8 a 14 días

Grupo 3: de 15 a 21 días

Grupo 4: de 22 a 28 días

Grupo 5: de 29 a 35 días

Grupo 6: de 35 a 45 días

El grupo cero corresponde a animales recién nacidos de cero días de edad que no han consumido calostro, de modo que están exentos de los componentes transferidos a través de inmunidad pasiva por lo que no están influenciados por estos factores. Se emplearon en total, 3 animales para el grupo cero, 33 animales para el grupo de los animales sanos (los grupos 1, 5 y 6 emplearon 6 animales por grupo cada uno) y 30 animales con diarrea manteniendo 5 animales por grupo etario.

Los animales seleccionados en el grupo con enteropatía fueron animales con signos clínicos evidentes de diarrea, sin tomar en cuenta las características de ésta o su período de duración a la fecha de la toma de muestra ya que tales datos no pudieron ser consignados fehacientemente por los criadores. Sin embargo, se excluyeron a los animales que habrían recibido tratamiento antibiótico alguno durante el proceso diarreico debido a la posible alteración del medio intestinal e interferencia con la síntesis y producción de citoquinas.

No se emplearon técnicas diagnósticas para la identificación de los agentes causales en los casos de diarrea salvo el uso de láminas teñidas con hematoxilina eosina para la comprobación y descripción del cuadro de enteropatía y sus lesiones en tracto intestinal.

Para efectos de la cuantificación relativa, se tomó al grupo cero como calibrador interno para emplear la técnica de cuantificación relativa  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Litvak y Schmittgen, 2001). Dado que no existen referencias acerca del uso de fármacos para la eutanasia en alpacas, se empleó la metodología descrita por Swindle (1998). Se empleó una combinación de Ketamina (20 mg/Kg IM) y clorhidrato de Xylacina (2 mg/Kg IM) para conseguir la anestesia general del animal. Finalmente, se aplicó una sobredosis de pentobarbital sódico (70 mg/Kg IV) produciendo en el animal un paro cardio-respiratorio. Se comprobaron los signos vitales para confirmar el deceso de los animales y proceder con las necropsias y toma de muestras.

### **3.2. Toma de muestras**

Las muestras fueron colectadas durante las necropsias de los animales. Para las técnicas moleculares, se tomaron porciones de 2cm de longitud del segmento medio del yeyuno de forma aséptica. Los segmentos fueron inmediatamente lavados en suero fisiológico al 0.9% estéril para eliminar restos de contenido intestinal potencialmente inhibidores de las técnicas moleculares. Los segmentos fueron colocados en crioviales estériles de 2ml de capacidad, rotulados y congelados en nitrógeno líquido (-196° C) para su transporte hacia el laboratorio.

Para la histopatología, se tomaron muestras adyacentes a las tomadas para las técnicas moleculares, de una longitud de 2cm y que fueron lavadas en suero fisiológico estéril y fijadas en formaldehído tamponado al 10% para su empleo en la elaboración de láminas histológicas teñidas con Hematoxilina – Eosina (HE).

### **3.3. Procesamiento de muestras**

Los segmentos intestinales fueron descongelados gradualmente desde -196° C seguido de -70° C, -20° C y a 4° C. Seguidamente, se procedió a realizar el raspado profundo del tejido intestinal mediante hoja de bisturí a 4° C sobre placa Petri estéril. El contenido obtenido del raspado fue lavado 3 veces en PBS 0.15M pH 7.2 para eliminar restos de contenido intestinal inhibidores del PCR y el pellet final fue resuspendido en 500µl de agua libre de nucleasas y congelado a -70° C hasta la extracción de ARN total.

Las muestras destinadas para histopatología fueron reducidas y enviadas para la elaboración de láminas teñidas con Hematoxilina-Eosina sobre portaobjetos positivados con Poli- L-Lisina.

### **3.4. Extracción de ARN total**

La extracción empleó el reactivo TRIZOL® (Invitrogen, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este método se basa en el uso de una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina para la lisis de las células y la separación de la muestra en dos fases (acuosa y orgánica), seguida de la extracción y precipitación del ARN total con cloroformo e isopropanol respectivamente a partir de la fase acuosa. Brevemente, los pellets fueron incubados a temperatura ambiente por 3 minutos con el reactivo para luego adicionarles cloroformo frío. Tras centrifugar, se tomó la fase acuosa de la mezcla y el ARN total fue precipitado con alcohol isopropílico frío, centrifugado e inmediatamente lavado con Etanol frío al 70%. Finalmente, el ARN fue

resuspendido en 60µl de agua libre de nucleasas y almacenado a -70° C hasta su uso en el RT-PCR.

### 3.5. Síntesis de ADNc (Transcripción reversa)

El ARN obtenido de cada una de las muestras fue tomado como templado para la síntesis de ADNc (ADN complementario) empleando el kit “SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR” (Invitrogen, USA), según las instrucciones del fabricante. El kit emplea la transcriptasa reversa MuLV H+ para generar ADNc a partir de moléculas de ARN templado en las muestras y viene proveído de dNTP, hexámeros al azar (0.2µM, concentración final) y sales para optimizar la reacción.

Todo el material empleado fue nuevo y libre de nucleasas, adicionalmente, la habitación y materiales como pipetas, gradillas y demás materiales plásticos no perecibles fueron irradiados con luz ultravioleta por espacio mínimo de 12 horas previas a su uso.

Los componentes de la reacción se prepararon como premezcla de Síntesis de ADNc, teniendo en cuenta el número de muestras y volumen final de reacción por muestra, mediante su mezcla en tubos eppendorf de 2ml de capacidad, nuevos y libres de nucleasas previo tratamiento de autoclavado por tres veces. Esta premezcla se mantuvo en hielo durante su preparación y antes del uso para prevenir el inicio de la reacción a temperatura ambiente. Las concentraciones finales de los componentes de la síntesis de ADNc en un volumen final de 20ul por reacción/muestra fueron agregados en el siguiente orden y concentración:

|                    |            |
|--------------------|------------|
| 2x RT Reaction mix | 10 µl x n* |
| RT enzyme mix      | 1 µl x n   |
| Hexámeros al azar  | 1 µl x n   |
| H <sub>2</sub> O   | 6 µl x n   |

*\*Donde “n” significa el número de muestras a trabajar.*

Se dispensaron 18µl del master mix en tubos descartables individuales con tapa incorporada para termociclador de 200µl de capacidad. Seguidamente, se añadieron 2µl de ARN templado de cada una de las muestras en los tubos correspondientes de modo que el templado no exceda el 10% del volumen final de reacción. Las muestras fueron llevadas al termociclador PTC-200 Engine Chromo IV de MJ Research – Biorad (USA) programado con el siguiente protocolo: 25° C por 10 minutos, 50° C por 30 minutos, terminando la reacción a 85° C por 5 minutos. Se añadió 2 UI de RNasa H<sup>+</sup> de *E.coli* (proveído por el kit) a cada pocillo y se incubó a 37° C por 20 minutos para destruir la molécula ARN del híbrido ARN: ADNc. El ADNc obtenido fue congelado a -70° C hasta su uso en la reacción de PCR Tiempo Real.

### **3.6. PCR Tiempo Real**

Para realizar la técnica de PCR Tiempo Real se usaron los oligonucleótidos descritos por Odbileg y col (2006, 2008), diseñados sobre secuencias publicadas para bovino y camello (Cuadro 1). Asimismo, se incluyeron oligonucleótidos para la amplificación específica de transcritos de GAPDH (Patil y col., 2004) como gen interno para la normalización de la cuantificación relativa.

**Cuadro 1.** Oligonucleótidos empleados para la técnica RT-PCR Tiempo real de la citoquinas de la respuesta Th1 y Th2 en alpacas (Odbileg y col., 2006 y 2008).

| Citoquina           | Tamaño (pb)* | Secuencia             | Ta** | Acceso GenBank           |
|---------------------|--------------|-----------------------|------|--------------------------|
| IL 2 F (5')         | 202          | AAACTCTCCAGGATGCTCAC  | 53   | AB246671                 |
| IL 2 R (3')         |              | GGAAGTGAAGGGATCTGAAA  |      |                          |
| IFN $\gamma$ F (5') | 258          | ATTGTCTCCTTCTACTTCAA  | 53   | AB107657.1               |
| IFN $\gamma$ R (3') |              | AGCGGAAGAGAAGTCAGAAT  |      |                          |
| IL 4 F (5')         | 203          | CAAAGAACACAAGTGAAGAAG | 51   | AB246673.1               |
| IL 4 R (3')         |              | GGCTAAAGAAGATTATGAAG  |      |                          |
| IL 10 F (5')        | 246          | AAGCCTTGTCGGAGATGAC   | 55   | AB246674.1               |
| IL 10 R (3')        |              | AGCCATGAGTGAGTTCGACA  |      |                          |
| GAPDH F (5')        | 356          | GTGAAGGTCGGAGTGAACG   | 60   | Patil <i>et al.</i> 2004 |
| GAPDH R (3')        |              | GAGATGATGACCCTCTTGGC  |      |                          |

\*Longitud expresada en pares base.

\*\* Temperatura de annealing

Se empleó el ADNc de cada una de las muestras como templado para la reacción de PCR con el kit “SuperScript<sup>TM</sup> III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR” (Invitrogen, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La reacción PCR utiliza la polimerasa hot Start *Taq Platinum* modificada para mayor estabilidad contenida en 2x qPCR Master mix que contiene SYBR Green II, buffer, 5mM de MgCl<sub>2</sub>, dNTP mix (0,2  $\mu$ M concentración final) y como referencia pasiva se utilizó ROX 50x también proveído por el kit. Los oligonucleótidos fueron diluidos en agua libre de nucleasas para obtener soluciones de trabajo de 10  $\mu$ M de forma que su concentración final en la reacción fue de 0.2  $\mu$ M en todos los casos.

Igualmente, se utilizó material nuevo y libre de nucleasas, mientras que el espacio y materiales no perecibles plásticos fueron irradiados con luz



ultravioleta anteriormente a su utilización. En este caso, se prepararon los master mix mediante la mezcla de sus diferentes componentes en tubos eppendorf de 2ml de capacidad en el siguiente orden y concentración para un volumen final de 20ul por reacción/tubo:

|                             |                 |
|-----------------------------|-----------------|
| Sybr green super mix        | 10 $\mu$ l x n* |
| Primer Forward (10 $\mu$ M) | 0.4 $\mu$ l x n |
| Primer Reverse (10 $\mu$ M) | 0.4 $\mu$ l x n |
| ROX (1:10)                  | 1 $\mu$ l x n   |
| Agua libre de nucleasas     | 6.2 $\mu$ l x n |

*\*n significa el número de muestras a trabajar.*

Se añadió 2  $\mu$ l de ADNc de cada una de las muestras en los pocillos correspondientes, de modo que el templado representa el 10% del volumen final de reacción.

Se utilizó el termociclador PTC 200 (Peltier therme cycler) Chromo 4 (detector continuo de fluorescencia) de MJ Research – BioRad (USA) programado según el set de oligonucleótidos empleado (Cuadro 1): 95° C por 10 minutos (desnaturalización inicial y activación de la polimerasa), seguido de 40 ciclos de 94° C por 30 segundos, X°C por 30 segundos (hibridación según oligonucleótido, ver cuadro 1), 72° C por 30 segundos (extensión) y lectura de placa, curva de disociación desde 65° C hasta 95° C con lectura de placa cada 0.3° C; y 4° C indefinidamente para mantener los productos. Una vez terminado el proceso (stop), los tubos fueron retirados del termociclador y congelados a -20° C. El software empleado para el termociclador y el cabezal Chromo 4 fue el Opticon Monitor 2 v2.0.3.

Adicionalmente, mezclas (pooles) de los productos fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñidos con Bromuro de Etidio y visualizados en un Transiluminador UV (UltraLum, USA) para comprobar su pureza e identidad a través de la comprobación de su longitud en pares base. De existir productos adicionales, se emplearon 2U de DNAsa (PROMEGA, USA) a

fin de eliminar tales productos derivados de ADN genómico presente en las muestras ya extraídas.

### 3.7. Cuantificación Relativa

Se empleó la técnica  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  como técnica de cuantificación de la expresión relativa de genes detectables a través de RT-PCR Tiempo Real. Este tipo de cuantificación relativa relaciona la señal de PCR de transcritos de un grupo tratado en relación a otra muestra o grupo control sin tratamiento, describiendo el cambio de expresión de un gen objetivo en relación a un grupo de referencia como un grupo no tratado o una muestra en el tiempo cero del periodo total del estudio (Livak y Schmittgen, 2001). Esta aproximación sigue la siguiente fórmula:

$$N = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Donde:

N = Cantidad relativa de ARNm con respecto al calibrador

$\Delta\Delta C_t$  = Diferencia entre el control endógeno y el ARNm a analizar con respecto al calibrador

Debido a la exigencia de este tipo de cuantificación, todas las muestras tomadas tuvieron la misma longitud (2cm), se tomaron en la misma porción intestinal y fueron procesadas de manera similar, empleando el mismo volumen durante la síntesis de ADNc y el PCR Tiempo Real a fin de homogenizar la cantidad inicial de ARN presente en las muestras. La técnica  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  permite hacer cuantificación relativa teniendo en cuenta que la cantidad de ARN inicial es distinta entre las muestras, siempre y cuando se haya procurado que éstas se hayan tomado de tejidos similares y que posean características similares (longitud, peso, número de células) (Wong y Medrano, 2005).

Adicionalmente, el uso del gen de referencia permite corregir efectos de variaciones en la cantidad de ARNm inicial, especialmente si se usan polimerasas tipo Platinum. El gen GAPDH usado en este estudio es uno de los más empleados como gen de referencia o normalizador histórico, junto a otros como  $\beta$ -actina, que si bien sufren un grado de variación en expresión en diferentes tejidos a pesar de no ser un gen estrictamente inducible, tal variación se corrige al emplear ARN extraído del mismo tejido donde se pretende cuantificar el gen problema. Es decir, la técnica sólo es aplicable si se mide el gen problema y el gen de referencia bajo las mismas condiciones de amplificación y la cuantificación de ambos se realice sobre el mismo ARN extraído del mismo tejido del individuo (Huggett y col., 2005).

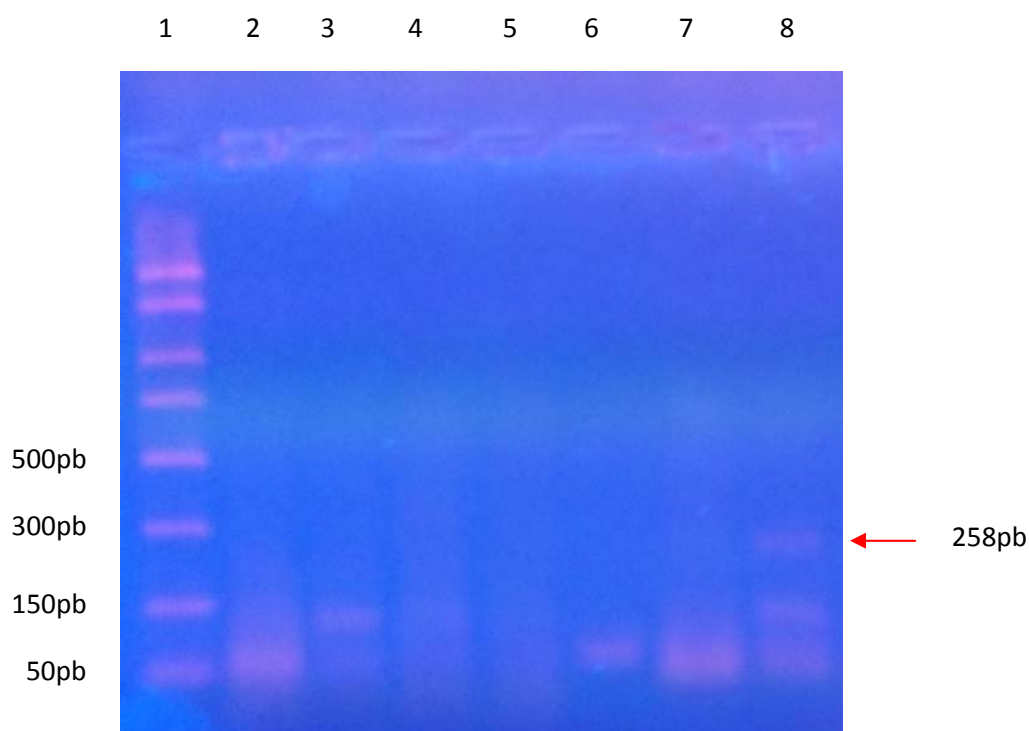
### **3.8. Análisis Estadístico**

Los resultados de la técnica  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  fueron analizados con la prueba de T de Student para evaluar la existencia de diferencia estadística significativa entre los animales sanos y enfermos (estado sanitario). Seguidamente, se evaluó la existencia de diferencia estadística dentro de cada grupo de acuerdo a la edad del animal empleando la prueba de ANOVA de una vía. De encontrarse diferencia estadística, se empleó la prueba de Tukey para identificar a los grupos diferentes y el coeficiente de correlación de Spearman para evaluar el nivel y sentido de correlación entre las variables edad y expresión de citoquinas. Se hizo uso del software estadístico Stata SE 10.1

## IV. RESULTADOS

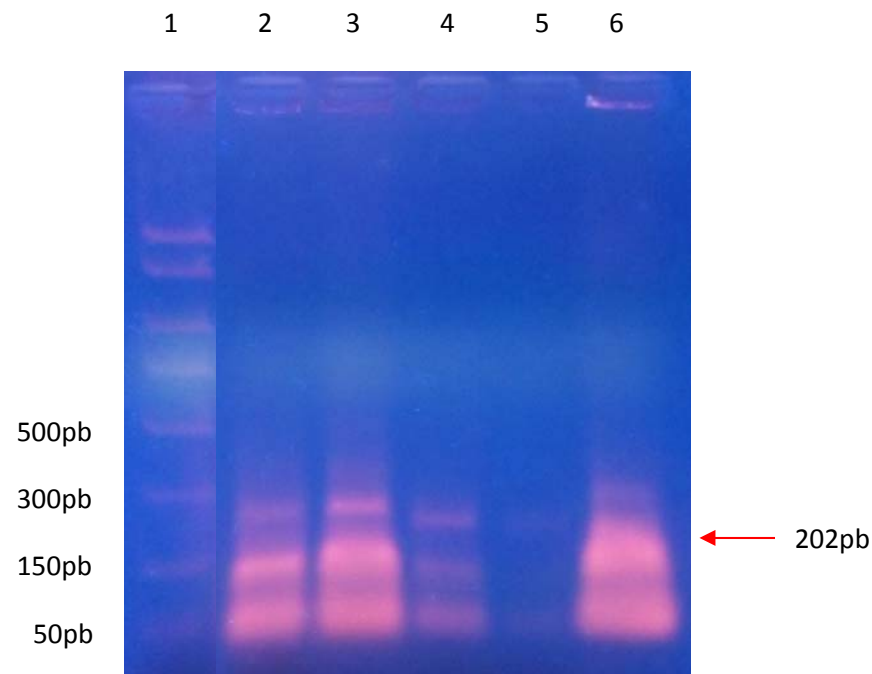
### 4.1.- CITOQUINAS DE LA RESPUESTA TH1

Los productos de la RT-PCR analizados a través de electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, mostraron tamaños específicos acorde a lo descrito por Odbileg y col (2006 y 2008) (Figura 1). Como muestra la figura, tras la extracción de ARN empleando TRIZOL se observaron los productos esperados para IFN- $\gamma$ , únicos y de 258pb aproximadamente, denotando la especificidad de los oligonucleótidos por el ARNm, ya que no se hallaron otros productos que tengan como templados el ADN genómico (son de mayores tamaños por tener varios exones e intrones el gen).



**Figura 1.** Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de los productos amplificados con oligonucleótidos IFN- $\gamma$ .1: *Marcador 50-2000pb. 2 al 6: productos amplificados a partir de ADN extraído de tejido intestinal de crías de alpaca. 7 y 8: productos amplificados a partir de ARN total extraído de tejido intestinal de crías de alpaca.*

En el caso de IL-2 se observa la presencia de una banda ubicada entre los 300pb y 202pb del marcador de ADN, que es la esperada para el producto según Odbileg y col (2006 y 2008), teniendo como templados el ARN total extraído con TRIZOL así como teniendo como templados el ADN genómico (Figura 2), evidenciando la capacidad de los oligonucleótidos para amplificar productos específicos a partir de templado genómico (de mayor peso molecular al incluir intrones) así como a partir de ARN mensajero (202pb). Seguidamente, se aplicó DNasa al extraído con trizol para eliminar el producto genómico y someter los templados a PCR Tiempo Real.



**Figura 2.** Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de los productos amplificados con oligonucleótidos IL-2. 1: *Novagen Perfect PCR Marker 50-2000pb*. 2 al 4: *productos amplificados a partir de ADN extraído de tejido intestinal de crías de alpaca*. 5 y 6: *productos amplificados a partir de ARN total extraído de tejido intestinal de crías de alpaca*.

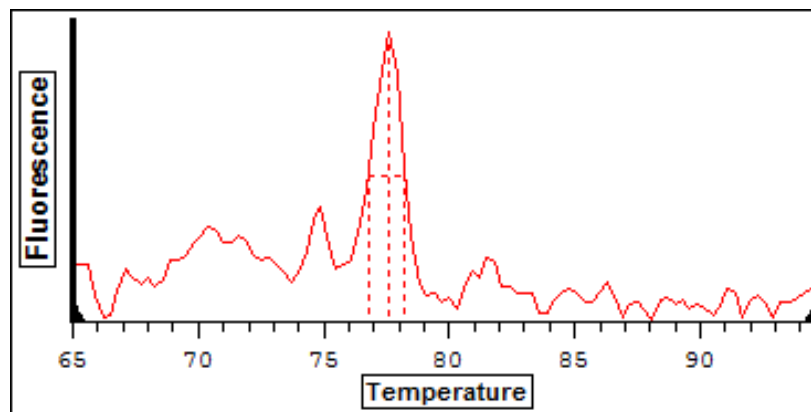
En ninguno de los casos se logró determinar diferencias de intensidad de los productos en animales sanos o con enteropatía a través de la técnica de electroforesis en gel de agarosa.

Adicionalmente, se comprobaron los productos de la amplificación de ARNm de GAPDH mediante la misma técnica, encontrándose correspondencia de los productos amplificados con los descritos por Patil y col (2004). Asimismo, no se observaron diferencias entre animales sanos o con enteropatía en cuanto a tamaño o intensidad del producto amplificado, tal cual lo descrito por More (2010).

#### **4.1.1.- RT-PCR Tiempo Real: IFN $\gamma$**

Los resultados del tiempo real para las citoquinas características de la respuesta Th1 muestran patrones distintos entre el grupo de animales sanos y aquellos enfermos con enteropatía. En los animales sanos, tanto IL2 como IFN $\gamma$  presentan una tendencia ascendente de producción desde la primera semana de edad, alcanzando la expresión máxima entre la tercera y quinta semana de edad en ambos casos. Sin embargo, los animales enfermos presentan una expresión muy alta con respecto al calibrador y a los animales sanos, particularmente en el caso de IL-2 donde los animales enfermos expresan hasta 10 000 veces lo expresado por los animales sanos.

En detalle, se encontró que los animales sanos expresan niveles detectables de IFN $\gamma$  que pudieron ser evaluados a través de la técnica cuantitativa a partir del nacimiento. Los productos amplificados mediante RT-PCR tiempo real tuvieron valores de Ct (Cycle threshold o ciclo umbral) variables entre 34.11 y 38.05. Estos productos mostraron temperaturas de disociación (Tm) homogéneas entre 77.3 y 78.5 °C, evidenciando la presencia de un solo producto específico al haber ausencia de picos de temperatura adicionales. De los 36 animales sanos, se hallaron dos animales con productos de 77.3 °C (6%), seis (6) presentaron productos de 78.2-78.5 °C (17%) y 28 presentaron un producto de 77.6-77.9 °C (77%) (Figura 3, Cuadro 2).



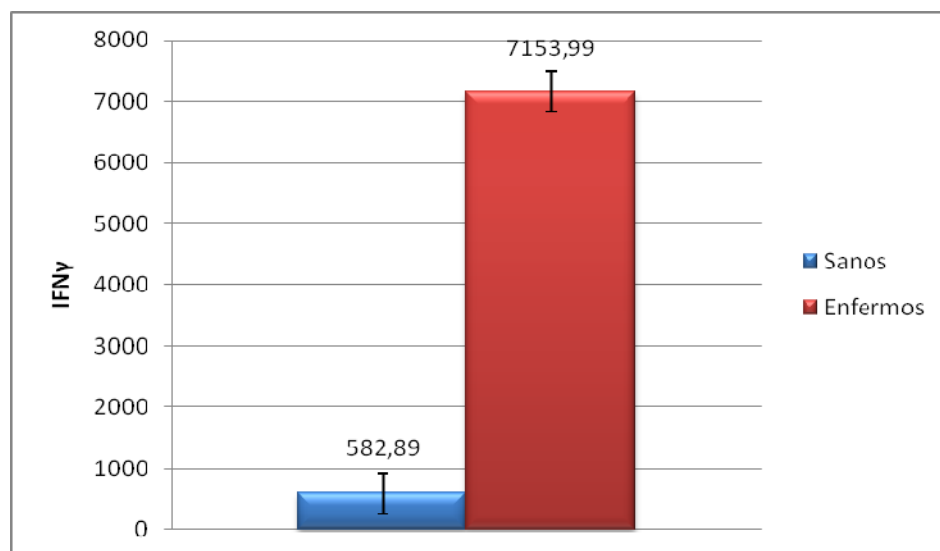
**Figura 3.** Temperatura de disociación de productos de RT-PCR amplificados con oligonucleótidos para IFN $\gamma$  en ARN de intestino delgado de crías de alpaca sanas. Rojo:  $T_m$  de 77.9°C.

En los animales enfermos se encontraron productos con la misma temperatura de disociación que los encontrados en los animales sanos. Similarmente a los animales sanos, el producto con  $T_m$  más bajo (77.3 °C) tuvo la menor frecuencia de 12.5% (4/32); mientras los productos de 77.6-77.9 y 78.2-78.5 °C tuvieron igual frecuencia relativa en los animales enfermos (43.75%, 14/32) (Cuadro 2, Figura 3).

**Cuadro 2.** Frecuencia relativa (Fr) de productos amplificados mediante RT-PCR tiempo real empleando oligonucleótidos contra IFN $\gamma$  en ARN obtenido de intestino de crías de alpaca según temperatura de disociación ( $T_m$ ).

| <b>T° de disociación</b> | <b>Fr en Sanos</b> | <b>Fr en Enfermos</b> |
|--------------------------|--------------------|-----------------------|
| <b>77.3 °C</b>           | 6.7%               | 12.5%                 |
| <b>77.6-77.9 °C</b>      | 76.7%              | 43.75%                |
| <b>78.2-78.5 °C</b>      | 16.7%              | 43.75%                |

El análisis de cuantificación relativa de la expresión de IFN $\gamma$  en el grupo total de crías de alpaca sanas y crías con enteropatías demostró que los niveles promedio de expresión son siempre mayores que las crías recién nacidas que no han consumido calostro (calibrador). Se encontró que los animales enfermos expresan alrededor de 7154 veces lo expresado por el calibrador mientras que los animales sanos expresan en promedio 583 veces más que los mismos calibradores (Figura 4), existiendo una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre ambos grupos según la prueba de T de Student.

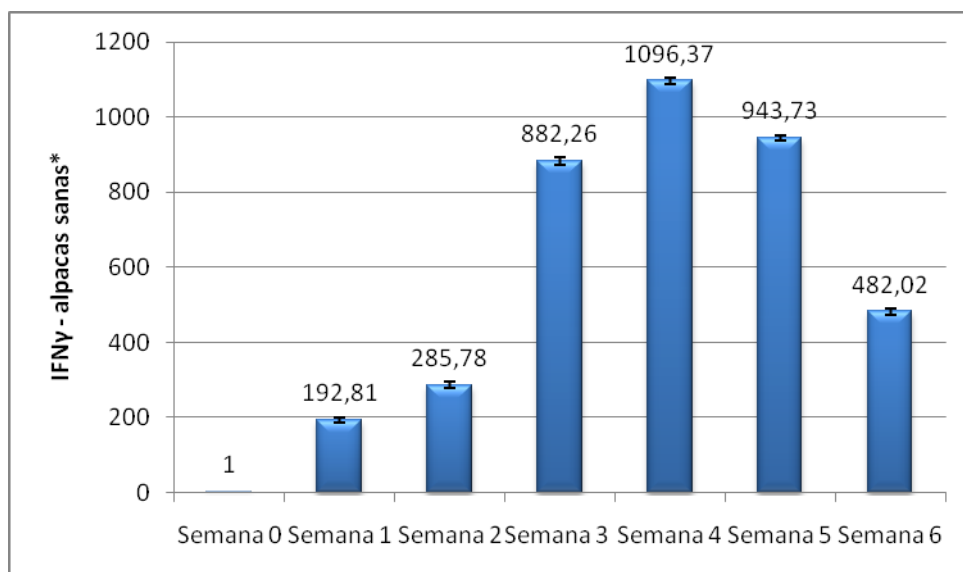


**Figura 4.** Niveles de expresión de IFN $\gamma$  en mucosa intestinal de crías de alpaca enfermas y sanas con respecto al calibrador. Cada barra representa la media  $\pm$  la SD de los dos grupos sanitarios evaluados. Existe diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) entre el grupo de animales sanos y enfermos.

La expresión de IFN $\gamma$  en los animales sanos denotó que esta citoquina en mucosa intestinal de crías de alpaca es detectable a partir del nacimiento y exhibe una tendencia creciente según la edad de los animales, encontrándose que la expresión máxima se alcanza entre la tercera y quinta semana de edad, siendo ésta de 1096 veces lo expresado por el calibrador a la cuarta semana de edad (Figura 5). La expresión fue de 193, 286, 882, 1096, 944 y 482 veces el calibrador a la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta y sexta semana de edad, respectivamente (ANEXO 3). Por otra parte, la prueba de ANOVA de una vía



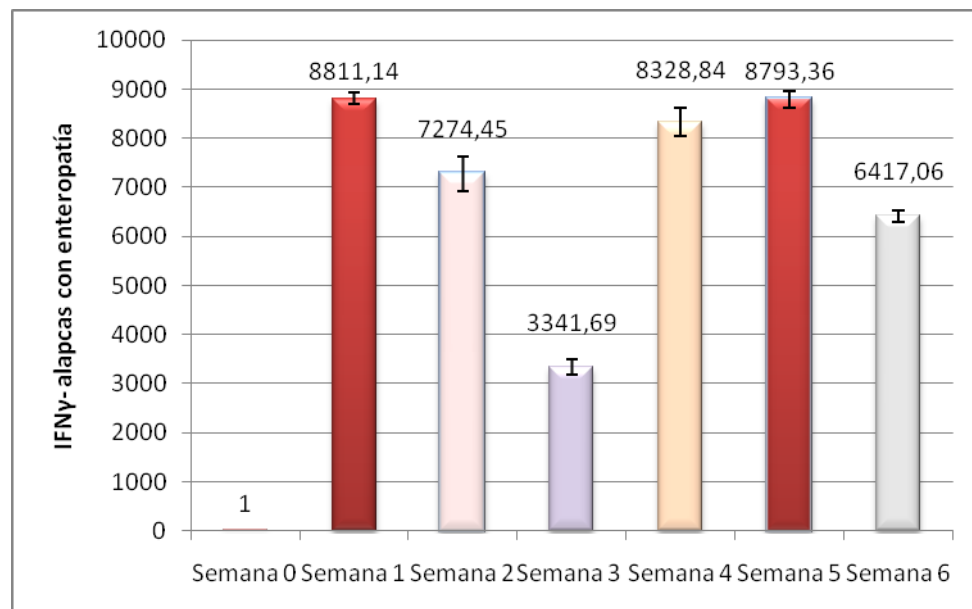
concluyó que existe diferencia significativa entre los grupos etarios dentro de este estrato sanitario ( $p < 0.05$ ). Seguidamente, la prueba de Tukey evidenció que la diferencia es significativa entre todos los grupos etarios y entre éstos y el grupo calibrador, lo que implica que todos los grupos son distintos entre sí. El análisis de correlación de Spearman indicó que existe moderada correlación positiva entre las variables edad y expresión de  $\text{IFN}\gamma$  (Coeficiente Spearman= 0.49).



**Figura 5.** Niveles de expresión de  $\text{IFN}\gamma$  en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas por semanas de edad. Cada barra representa la media  $\pm$  la SD de los grupos etarios evaluados. Existió diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) al comparar todas las semanas consecutivas.

En los animales que presentaron enteropatías se encontraron niveles elevados de  $\text{IFN}\gamma$  desde la primera semana de edad en relación a los neonatos empleados como calibradores, con variación entre los grupos etarios. Los niveles se mantuvieron entre 3342 y 8811 lo expresado por el grupo calibrador, manteniéndose por encima de 6417 veces en casi todos los grupos etarios salvo el descenso a 3342 veces durante la tercera semana de edad (el nivel más bajo de

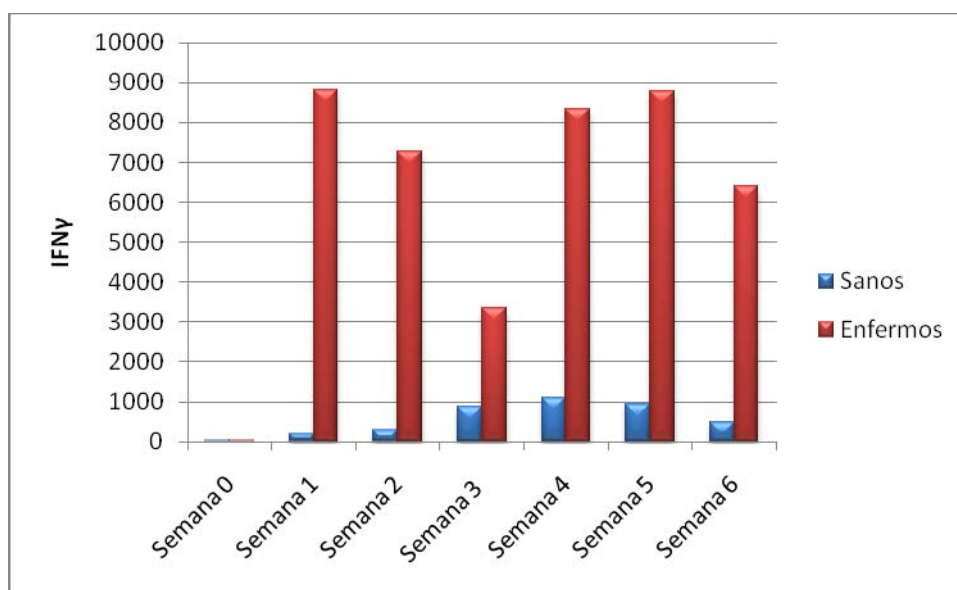
expresión detectado en este grupo sanitario). El valor máximo de expresión (8811 veces) se alcanzó durante la primera semana de edad (Figura 6). La prueba de ANOVA de una vía concluyó que existe diferencia significativa entre los grupos etarios ( $p < 0.05$ ), la prueba de Tukey evidenció que los niveles de expresión promedio de IFN $\gamma$  en todos los grupos etarios son distintos entre sí, salvo el grupo etario ubicado en la quinta semana de edad en relación al grupo de una semana de edad, entre los cuales no existe tal diferencia (ANEXO 7). El coeficiente de correlación de Spearman (-0.14) indica pobre correlación negativa entre las variables edad y expresión de IFN $\gamma$  en este grupo sanitario, lo que soporta la observación de falta de patrón en la expresión de esta citoquina en muestras intestinales de animales con enteropatía a diversas edades.



**Figura 6. Niveles de expresión de IFN $\gamma$  en mucosa intestinal de crías de alpaca con enteropatía por semanas de edad.** Cada barra representa la media  $\pm$  la SD de los grupos etarios evaluados. Las barras rojas no mostraron diferencia significativa entre sí.

Al comparar la expresión de IFN $\gamma$  entre ambos grupos sanitarios según semanas de edad, se observa que la cinética de expresión de esta citoquina en los animales sanos se define en forma de parábola (indicando la tendencia creciente gradual según edad) mientras que el patrón no es definido en los animales enfermos; aunque la expresión siempre es mayor en este grupo. La prueba de T

de Student concluyó que existe diferencia significativa ( $p<0.05$ ) entre sanos y enfermos en cada semana de edad evaluada en este estudio (Figura 7).



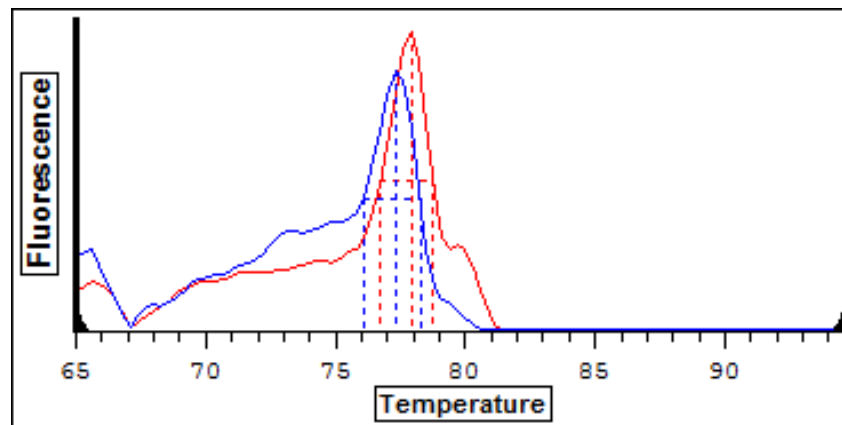
**Figura 7. Niveles de expresión de IFN $\gamma$  en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas y enfermas por semanas de edad.** Cada barra representa la media  $\pm$  la SD de los grupos etarios evaluados. Existió diferencia estadística significativa ( $P<0.05$ ) al comparar sanos con enfermos en todos los grupos etarios.

#### 4.1.2.- RT-PCR Tiempo Real: IL2

La expresión relativa de IL2 es muy diferente entre animales sanos y enfermos, siendo en éstos últimos extremadamente elevados en relación al calibrador (animales neonatos que no han consumido calostro).

Los valores de Ct (Cycle Threshold o ciclo umbral) en el grupo de animales sanos oscila entre 24.39 y 31.95, mientras que en los animales enfermos oscila entre 26.83 y 31.38. Todos los animales sanos tuvieron niveles detectables de ARNm de IL-2 desde el nacimiento, mientras que en los animales enfermos el 21% (7/33) no tuvieron niveles detectables de esta citoquina a través del RT-PCR Tiempo Real.

El análisis de temperatura de disociación de los productos amplificados demostró la presencia de un solo producto específico por muestra, que se corroboró con la observación de su peso molecular en gel de agarosa al 1.5% (Figura 8). Se encontraron tres temperaturas de disociación para los productos amplificados de IL2: el 69% (25/36) de los animales sanos expresaron un producto con 77.3-77.6 °C de T<sub>m</sub>, el 17% (6/36) expresó un producto de 77 °C y el 14% (5/36) expresó un producto de 77.9-78.2°C (Figura 8; cuadro 3).



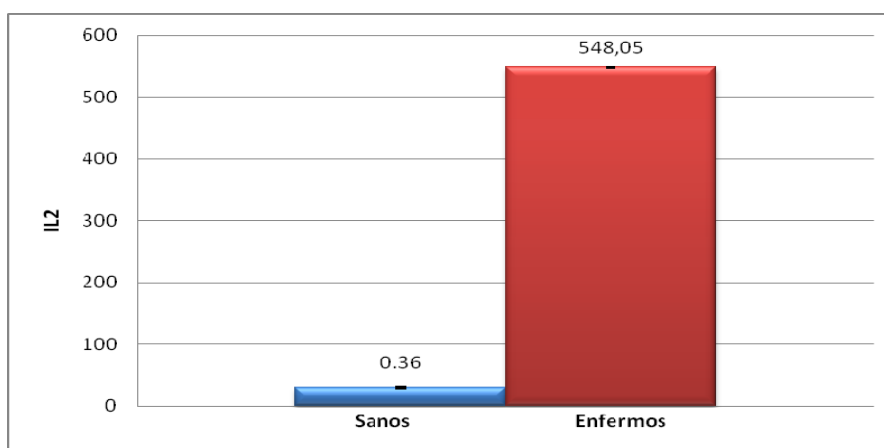
**Figura 8.** Temperatura de disociación de productos de RT-PCR amplificados con oligonucleótidos para IL2 en ARN de intestino delgado de crías de alpaca sanas y enfermas. Rojo: T<sub>m</sub> de 77.6°C, alpaca sana. Azul: T<sub>m</sub> de 77.3°C, alpaca con enteropatía.

En los animales enfermos se encontró que el 58% (19/33) expresó el producto de 77.3-77.6°C y el 21% (7/33) expresó el producto de 77 °C, pero otro 21% (7/33) no presentaba productos de amplificación de IL2 (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Frecuencia relativa (Fr) de productos amplificados mediante RT-PCR empleando oligonucleótidos contra IL2 en ARN obtenido de intestino de crías de alpaca según temperatura de disociación (Tm).

| T° de disociación | Fr en Sanos | Fr en Enfermos |
|-------------------|-------------|----------------|
| 77 °C             | 17%         | 21%            |
| 77.3-77.6 °C      | 69%         | 58%            |
| 77.9-78.2 °C      | 14%         | -              |
| No detectable     | -           | 21%            |

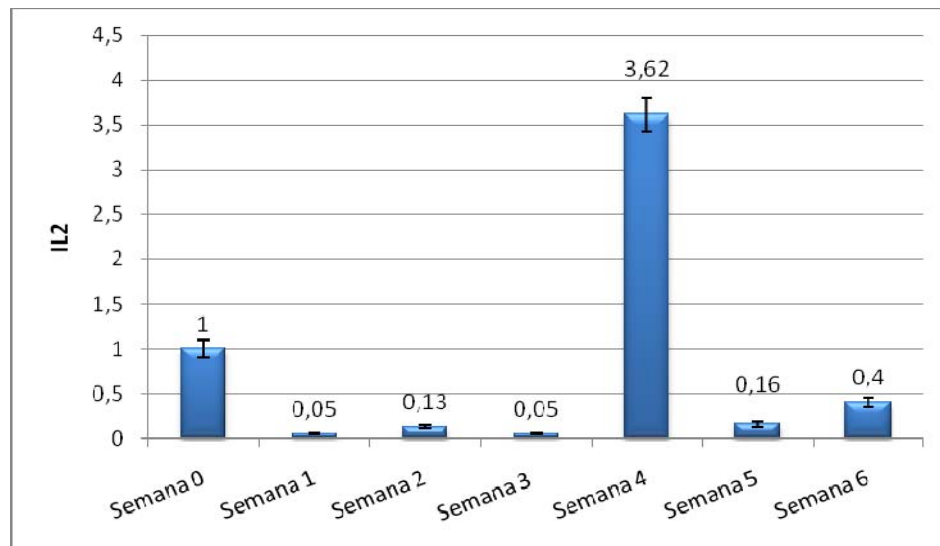
La cuantificación relativa de IL 2, comparando la totalidad de animales evaluados, indica que los animales sanos expresan menos IL 2 (0.36 veces) que el calibrador (recién nacido sin consumo de calostro); mientras que en general, el promedio de expresión en los animales enfermos fue de 548 veces lo expresado por el calibrador. La prueba de T de Student señala que los promedios de expresión en ambos grupos sanitarios son estadísticamente distintos ( $P < 0.05$ ) (Figura 9, ANEXO 4).



**Figura 9.** Niveles de expresión de IL2 en mucosa intestinal de crías de alpaca enfermas y sanas con respecto al calibrador. Cada barra representa la media  $\pm$  la SD de los dos grupos sanitarios evaluados. Existe diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) entre el grupo de animales sanos y enfermos.

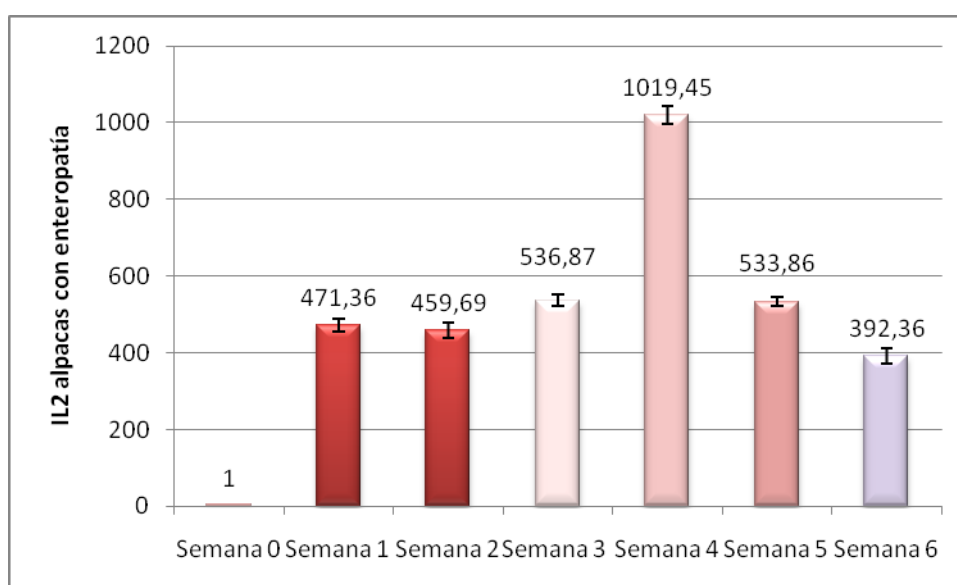
En detalle, los animales sanos presentan un patrón de crecimiento gradual e irregular sin sobrepasar la expresión del calibrador durante todo el periodo de evaluación, a excepción de la cuarta semana de edad donde se alcanza la expresión máxima de 3.62 veces más que el calibrador. Desde este punto hay disminución gradual y sostenida de la expresión a niveles nuevamente inferiores a los del grupo calibrador. La prueba de ANOVA de una vía señala la existencia de diferencia estadística entre los grupos etarios ( $p < 0.05$ ).

Seguidamente, la prueba de Tukey concluyó que los grupos de la semana 1, 2 y 3 no son distintos estadísticamente unos de otros, y que este bloque es estadísticamente diferente a los grupos de la cuarta, quinta y sexta semana; los que a su vez son distintos entre sí. Por ende, la expresión de IL2 en animales sanos es constante y discreta hasta la tercera semana de edad tras la cual hay un incremento en la expresión hacia la cuarta semana de edad que desciende gradualmente a niveles inferiores a lo expresado por el calibrador (Figura 10). Finalmente, el índice de correlación de Spearman (0.2152) evidencia débil correlación positiva entre las variables edad y expresión de citoquinas en este grupo sanitario.



**Figura 10. Niveles de expresión de IL2 en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas por edad con respecto al calibrador.** Cada barra representa la media  $\pm$  la SD de los dos grupos etarios evaluados. Existe diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) entre los grupos etarios.

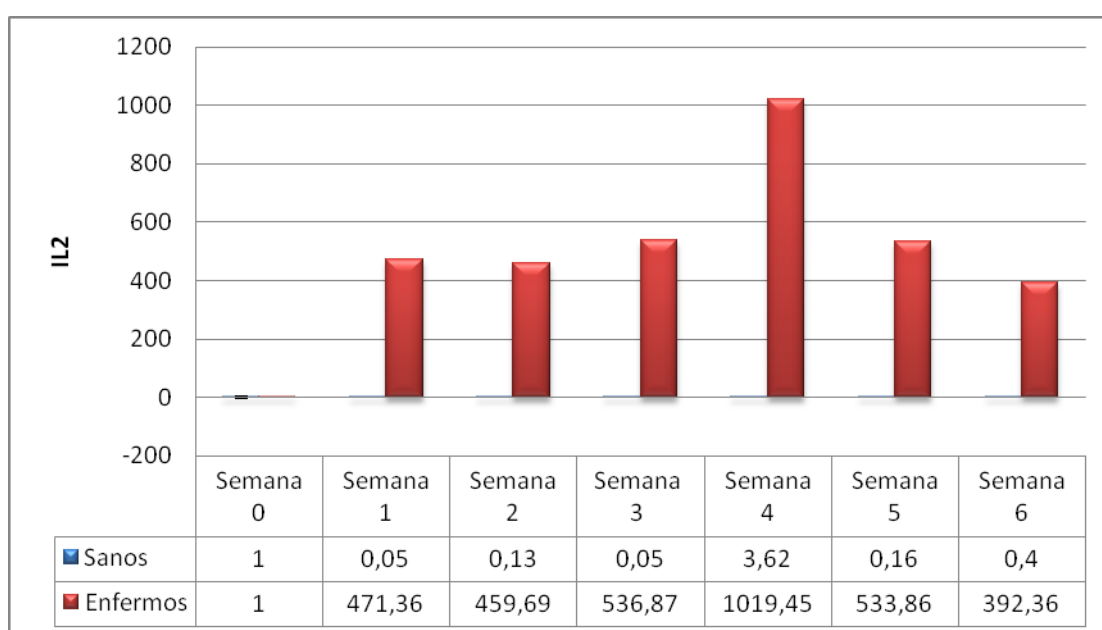
Por otro lado, los niveles de expresión de IL2 en animales con enteropatía son similares entre los grupos etarios, encontrándose muy por encima de lo observado en animales sanos. La expresión es de 471, 460, 537, 1019, 534 y 392 veces lo expresado por el calibrador, respectivamente según semana de edad (Figura 11).



**Figura 11.** Niveles de expresión de IL2 en mucosa intestinal de crías de alpaca con enteropatía por edad con respecto al calibrador. Cada barra representa la media  $\pm$  la SD de los grupos etarios evaluados. Existe diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) entre los grupos etarios. Barras del mismo color no expresan diferencia significativa.

Similarmente a lo observado para IFN $\gamma$  en los animales con enteropatía, el nivel máximo de expresión ocurre entre la tercera y quinta semana de edad. La prueba de T de Student concluye que existe diferencia significativa entre los grupos etarios ( $p < 0.05$ ). La prueba de Tukey determinó que los niveles de expresión de IL 2 no son distintos entre la primera y segunda semana de edad, y que este bloque es distinto al resto de grupos etarios, los que a su vez son distintos entre sí. A diferencia de lo observado en los animales sanos, se encontró correlación positiva débil (0.2475) entre las variables edad y expresión de IL2.

La comparación entre los grupos sanitarios (sano vs enteropatía) según edad demostró que existe diferencia estadística en todas las edades evaluadas ( $p<0.05$ ). A diferencia de lo observado para  $IFN\gamma$ , no se observa un patrón definido a manera de parábola para los animales sanos sino más bien este patrón parece aplicarse en menor medida a lo observado en animales enfermos (Figura 12). Asimismo, la diferencia entre ambos grupos, en general y por edades, es alta teniendo en cuenta que los niveles de expresión de IL2 difícilmente sobrepasan lo expresado por el calibrador en animales sanos.



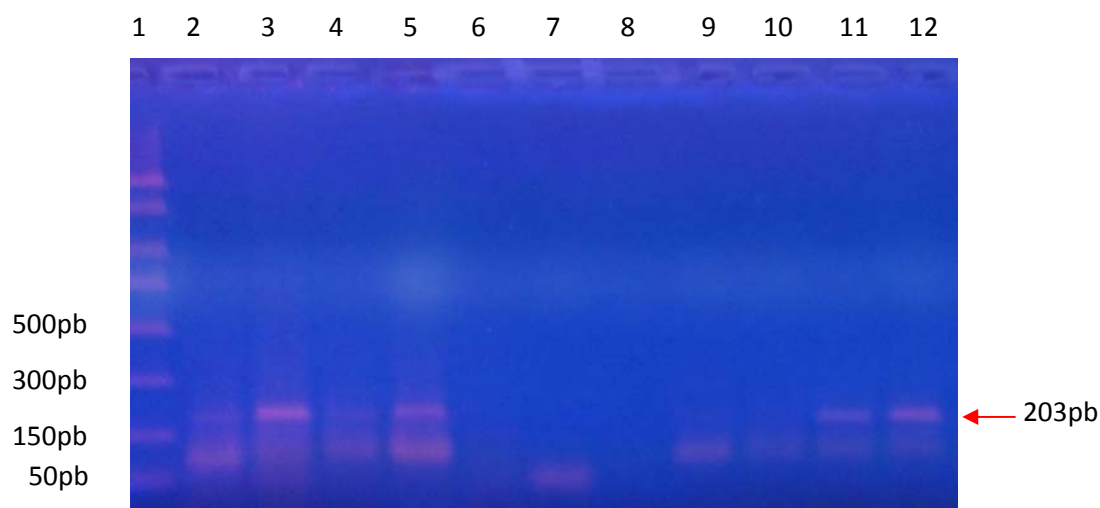
**Figura. 12. Niveles de expresión de IL2 en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas y enfermas por semanas de edad.** Cada barra representa la media  $\pm$  la SD de los grupos etarios evaluados. Existió diferencia estadística significativa ( $P<0.05$ ) al comparar sanos con enfermos en todos los grupos etarios.

## 4.2. Citoquinas de la respuesta Th2

Los productos de RT-PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa para confirmar la identidad y pureza de los productos. Los productos obtenidos a través del uso de oligonucleótidos para IL4 se observaron como una banda única de 203pb aproximadamente, tal cual lo descrito por Onuma y col (2006 y 2008)

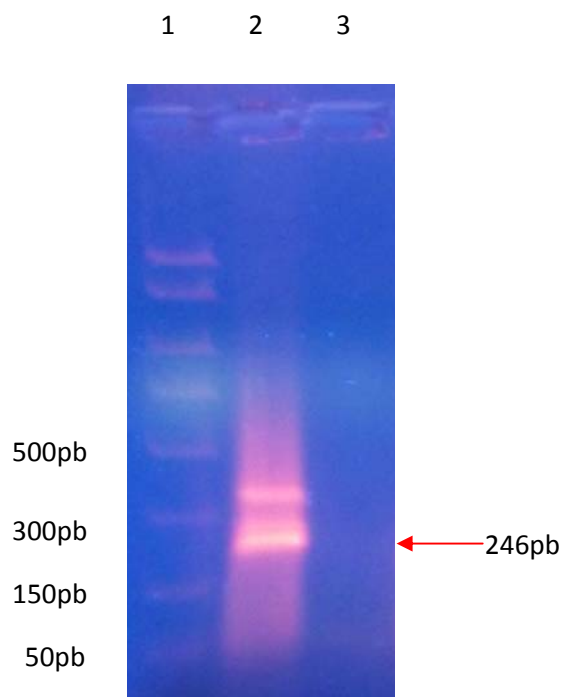


(Figura 13). La banda específica se presentó en las muestras de ARN extraído con TRIZOL, tanto en animales sanos como con enteropatía, sin presencia de bandas de mayor longitud correspondientes a la amplificación ADN genómico. De igual manera, se agregó DNAsa a la mezcla empleada para la síntesis de cDNA.



**Figura 13.** Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de los productos amplificados con oligonucleótidos IL4. 1: *Novagen Perfect PCR Marker 50-2000pb*. 2 al 12: *productos amplificados a partir de ARN extraído de tejido intestinal de crías de alpaca*.

Por su parte, los productos amplificados con oligonucleótidos para IL10 mostraron, además de la banda correspondiente al producto específico según su longitud en pares base (246pb) de acuerdo a lo descrito por Odbileg y col (2008), un producto de peso molecular más alto (mayor a 300pb) atribuible a la amplificación del mismo producto a partir de un templado de ADN genómico (Figura 14), de forma similar a lo observado para IFN $\gamma$ . Se emplearon 2U de DNAsa para eliminar el templado genómico y el ARN puro fue sometido a RT-PCR Tiempo Real.



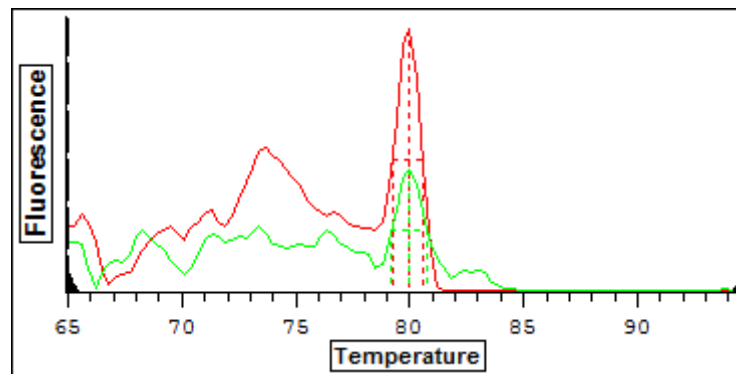
**Figura 14.** Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de los productos amplificados con oligonucleótidos IL10. 1: *Novagen Perfect PCR Marker 50-2000pb*. 2: *productos amplificados a partir de ARN extraído de tejido intestinal de crías de alpaca*. 3: *Vacío*.

#### 4.2.1.- RT-PCR Tiempo Real: IL4

Se observa que la expresión de IL4 presenta un patrón ascendente y gradual en los animales sanos, con niveles detectables de ARNm desde el nacimiento, aunque el 14% (5/36) de los animales sanos no tuvieron niveles detectables de IL4. A diferencia de ellos, los animales con enteropatía tuvieron un 24% (8/33) de muestras donde no pudo detectarse ARNm de IL4. Los niveles de expresión en animales enfermos siempre son mayores que en los animales sanos, pero no siguen un patrón establecido según la edad.

Los valores de Ct o ciclo umbral variaron entre 31.18 y 36.11 en los animales sanos mientras que los animales enfermos mostraron variación entre 30.79 y 35.65. El análisis de temperatura de disociación (Tm) de los productos de PCR mostró que el 75% de estos mismos animales (27/36) tuvieron un producto específico con 80.0-80.3 °C de Tm y el 11% (4/36)

mostraron el producto específico con 79.3-79.6 °C de  $T_m$  (Figura 15, cuadro 4). La identidad de estos productos con  $T_m$  distinto se comprobó a través de su longitud en pares base mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa (de la misma manera que se realizó para todas las citoquinas evaluadas).



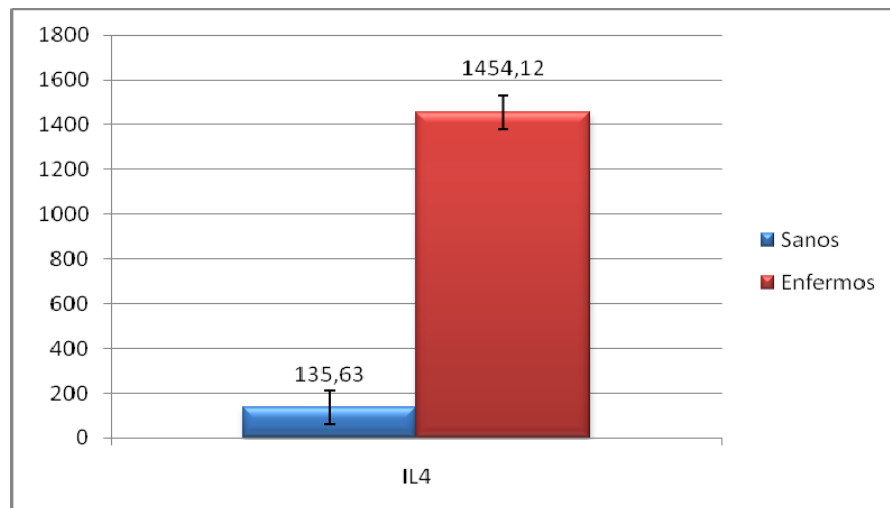
**Figura 15.** Temperatura de disociación de productos de RT-PCR amplificados con oligonucleótidos para IL4 en ARN de intestino delgado de crías de alpaca sanas (verde) y enfermas (rojo),  $T_m = 80.0^\circ\text{C}$ .

En los animales con enteropatías el 30% (10/33) exhibieron un producto con 80.0-80.3 °C de  $T_m$ , el 27% (9/33) exhibieron un producto con  $T_m$  de 79.4-79.7 °C y el 18% (6/33) tuvieron un producto con  $T_m$  de 80.9-81.5 °C, el que estuvo ausente en el grupo de animales sanos (Cuadro 4). En contraste con los animales sanos, no existe un verdadero producto claramente predominante en los animales enfermos. La proporción de animales que no presentan productos detectables es mayor que en los animales sanos además de exhibir un producto de IL4 con  $T_m$  mayor y que no se ha detectado en los primeros.

**Cuadro 4.** Frecuencia relativa (Fr) de productos amplificados mediante RT-PCR empleando oligonucleótidos contra IL4 en ARN obtenido de intestino de crías de alpaca según temperatura de disociación (Tm).

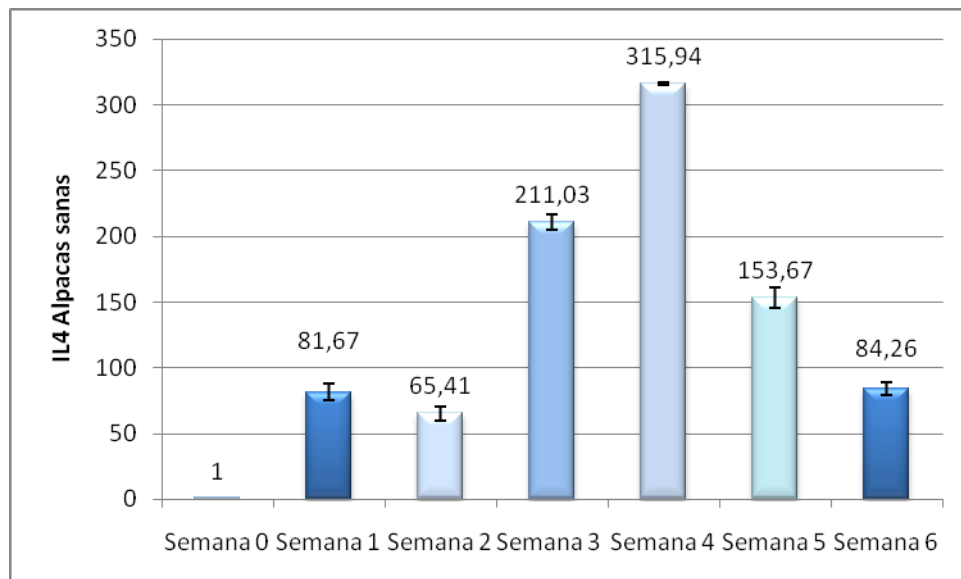
| <b>T° de disociación</b> | <b>Fr en Sanos</b> | <b>Fr en Enfermos</b> |
|--------------------------|--------------------|-----------------------|
| <b>79.4-79.7 °C</b>      | 11%                | 27%                   |
| <b>80.0-80.3 °C</b>      | 75%                | 30%                   |
| <b>80.9-81.5 °C</b>      | -                  | 18%                   |
| <b>No detectable</b>     | 14%                | 24%                   |

Comparando los niveles totales de expresión entre animales sanos y enfermos hasta los 45 días de edad, se observa que la expresión promedio en animales sanos es de 136 veces lo expresado por el calibrador mientras que los animales enfermos expresan en promedio 1454 veces lo expresado por el mismo (Figura 16). La diferencia entre ambos grupos sanitarios es significativa ( $p < 0.05$ ) según la prueba de T de Student y es similar a lo observado en la respuesta Th1 donde la expresión promedio hasta los 45 días de edad siempre es mayor en los animales con enteropatía (ANEXO 5).



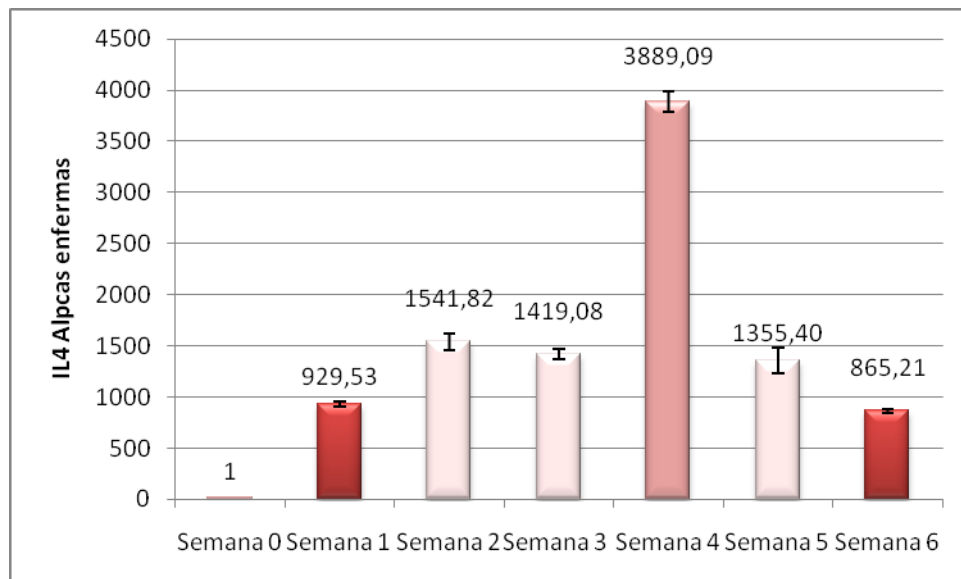
**Figura 16.** Niveles de expresión de IL4 en mucosa intestinal de crías de alpaca enfermas y sanas con respecto al calibrador. Cada barra representa la media  $\pm$  la SD de los dos grupos sanitarios evaluados. Existe diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) entre el grupo de animales sanos y enfermos.

Por su parte, los animales sanos presentan un patrón ascendente gradual similar a lo hallado para las citoquinas de la respuesta tipo Th1. La expresión es de 81.67, 65.41, 211.03, 315.94, 153.67 y 84.26 veces lo expresado por el calibrador en la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta y sexta semana de vida, respectivamente (Figura 17). Tal cual lo observado para citoquinas Th1, el máximo de expresión se alcanza entre la tercera y quinta semana, siendo el pico a la cuarta semana. La prueba de ANOVA de una vía concluyó que existe diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) entre los grupos etarios dentro de este grupo sanitario. En efecto, la prueba de Tukey identificó que todos los grupos etarios son distintos entre sí, a excepción de la expresión durante la primera y sexta semana de vida las que son estadísticamente no significativas. El coeficiente de correlación de Spearman (0.1963) denotó débil correlación positiva entre las variables edad y expresión de IL4 (ANEXO 8).



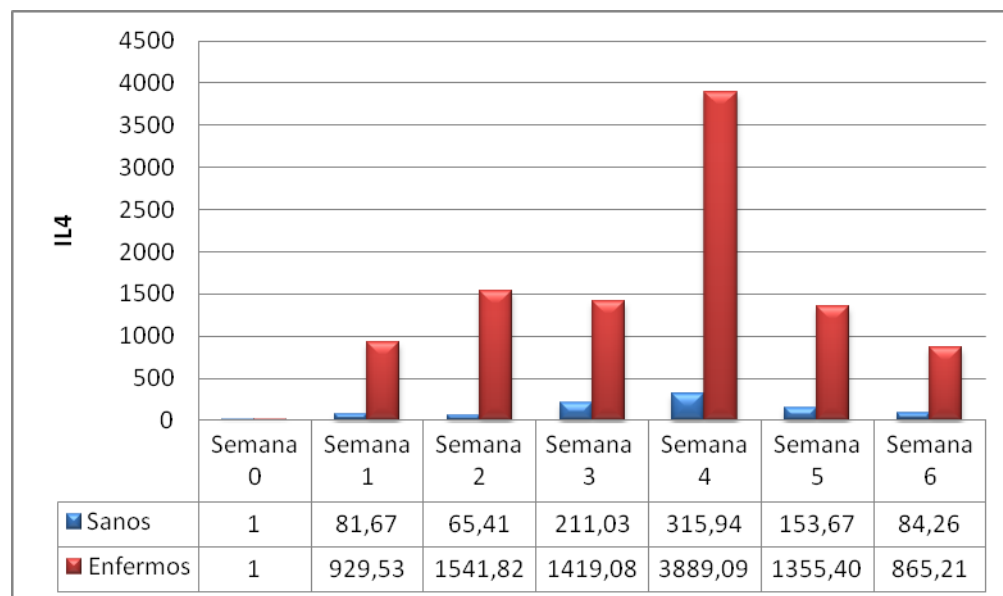
**Figura 17.** Niveles de expresión de IL4 en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas, según edad, con respecto al calibrador. Cada barra representa la media  $\pm$  la SD de los dos grupos sanitarios evaluados. Existe diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) entre el grupo de animales sanos por edad. *No hay diferencia significativa entre el grupo de una semana y seis semanas de edad.*

Los animales con enteropatía expresan mayores niveles de IL4 por cada semana de edad en relación al grupo calibrador y a los animales sanos. La expresión es alta y mantenida desde la primera semana de vida con un leve incremento entre la tercera y quinta semanas de edad, siendo el pico de expresión durante la cuarta semana de edad. La expresión hallada fue de 929.53, 1541.82, 1419.08, 3889.09, 1355.4 y 865.21 a la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta y sexta semana de edad, respectivamente (Figura 18). La prueba de ANOVA determinó que existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) dentro del grupo sanitario y la prueba de Tukey identificó que la diferencia está presente entre casi todos los grupos etarios a excepción de las comparaciones entre los grupos de las semanas 1 y 6, 2 y 3; y 3 y 5, donde no existe diferencia en el promedio de expresión y conforman bloques similares. La correlación de Spearman (0.1332) indica débil correlación entre las variables edad y expresión de IL4, algo más débil que la hallada en los animales sanos.



**Figura 18.** Niveles de expresión de IL4 en mucosa intestinal de crías de alpaca con enteropatía, según edad, con respecto al calibrador. Cada barra representa la media  $\pm$  la SD de los dos grupos sanitarios evaluados. *Colores distintos presentan diferencia estadística significativa.*

Comparando ambos grupos sanitarios por edad, el grupo de alpacas con enteropatía expresa niveles más altos de IL4 en todas las semanas de edad evaluadas en comparación con los animales sanos y el grupo calibrador (Figura 19). Existe una variabilidad en la expresión de IL4 en las crías con enteropatías indicando la prueba de T de Student que la diferencia en todos los grupos etarios es significativa ( $p < 0.05$ ).



**Figura 19.** Niveles de expresión de IL4 en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas y con enteropatía, según edad, con respecto al calibrador. Cada barra representa la media  $\pm$  la SD de los grupos sanitarios evaluados. Existe diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ).

#### 4.2.2.- RT PCR Tiempo Real IL10

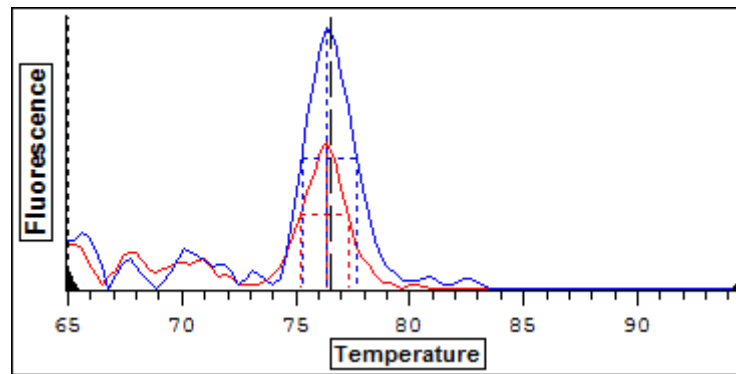
En el caso de IL10, en crías aparentemente sanas, se ha observado que el patrón de expresión se mantiene con respecto a lo descrito para las citoquinas anteriores. La expresión sigue una tendencia ascendente de forma gradual, alcanzando el máximo de expresión entre la tercera y quinta semana de edad. Los animales con enteropatías expresan distintos niveles de IL10 a las edades en estudio, siendo mayor al grupo calibrador y a los animales sanos en todos los grupos etarios evaluados.

El valor del Ct o ciclo umbral en los animales sanos varió entre 26.11 y 32.09 mientras que los enfermos se encontró entre 27.82 y 32.59. El análisis de temperatura de disociación mostró que el 17% (6/36) de los animales sanos no expresa niveles detectables de IL10, el 67% (24/36) tiene un producto de 76.1-76.7 °C y el otro 17% (6/36) expresa un producto de 75.2-



75.5 °C. Por su parte, los animales enfermos presentan productos de menor temperatura de disociación: el 18% (6/33) no presenta niveles detectables de esta citoquina, el 39% (13/33) expresa un producto de 73.4-73.7 °C, otro 39% expresa un producto de 74.0-74.9 °C y sólo el 3% (1/33) expresa el producto de 75.2-75.5 °C (Cuadro 5, Figura 20).

En ambos casos, la proporción de individuos que no posee niveles detectables de producto es similar y elevada (17-18%); aunque los animales enfermos presentan productos de menor temperatura de disociación que los productos encontrados en los animales sanos.

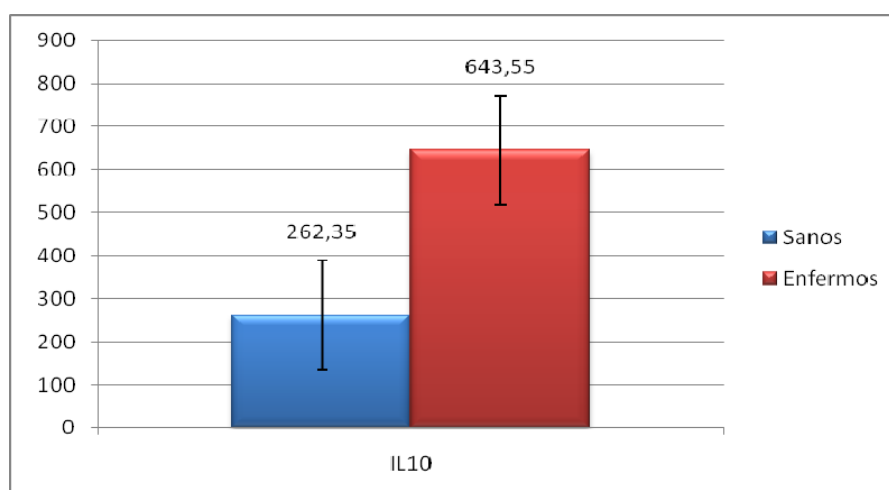


**Figura 20.** Temperatura de disociación de productos de RT-PCR amplificados con oligonucleótidos para IL10 en ARN de intestino delgado de crías de alpaca sanas,  $T_m = 76.1^\circ\text{C}$ .

**Cuadro 5.** Frecuencia relativa (Fr) de productos amplificados mediante RT-PCR empleando oligonucleótidos contra IL10 en ARN obtenido de intestino de crías de alpaca según temperatura de disociación (Tm).

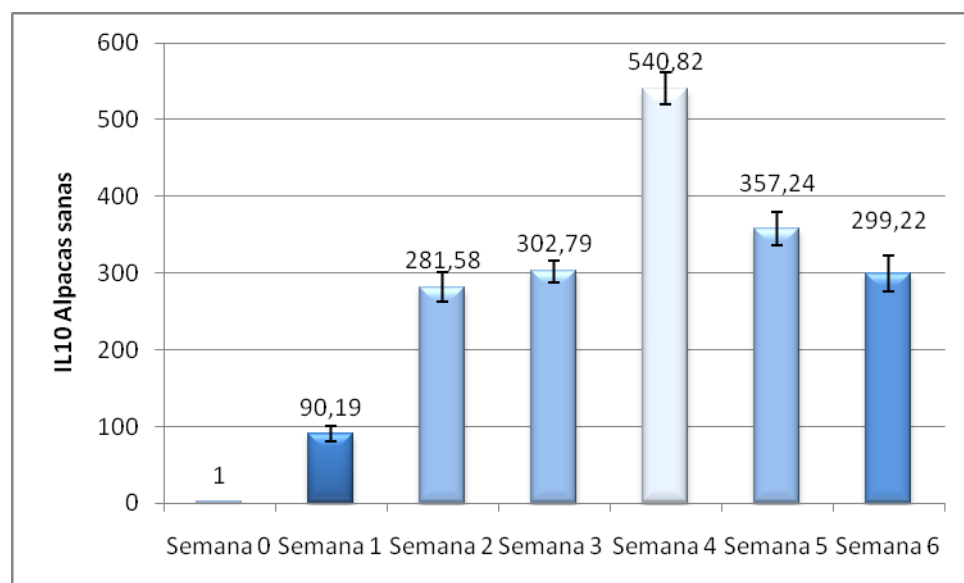
| T° de disociación | Fr en Sanos | Fr en Enfermos |
|-------------------|-------------|----------------|
| 73.4-73.7 °C      | -           | 39%            |
| 74.0-74.9 °C      | -           | 39%            |
| 75.2-75.5 °C      | 17%         | 3%             |
| 76.1-76.7 °C      | 67%         | -              |
| No detectable     | 17%         | 18%            |

Comparando los niveles promedio de expresión entre las crías de alpacas sanas y enfermas hasta los 45 días de edad, se tiene un promedio de 644 veces lo expresado por el calibrador en los enfermos y de 262 veces en sanos comparado con el mismo calibrador. La prueba de T de Student confirma que esta diferencia es significativa ( $p < 0.05$ ) (Figura 21).



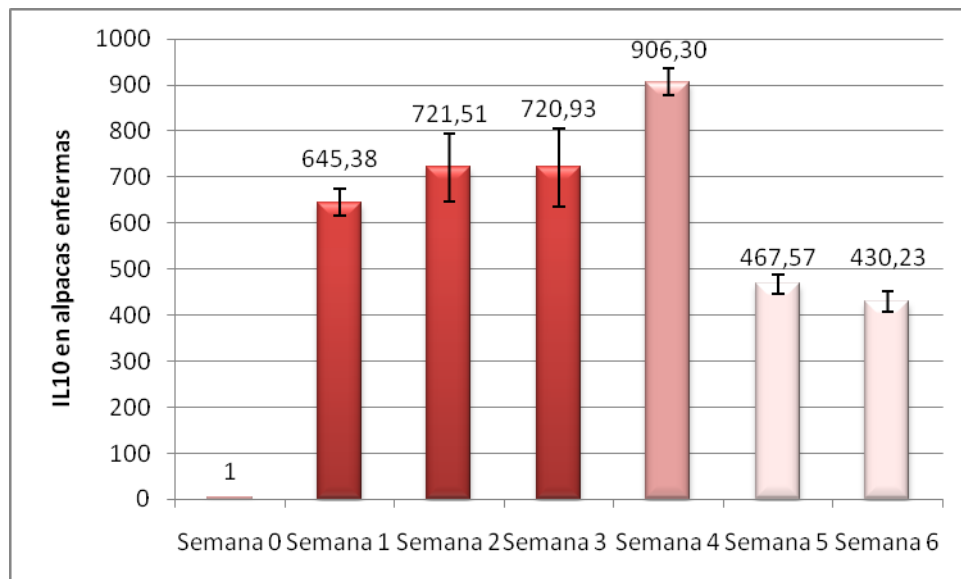
**Figura 21.** Niveles de expresión de IL10 en mucosa intestinal de crías de alpaca enfermas y sanas con respecto al calibrador. Cada barra representa la media  $\pm$  la SD de los dos grupos sanitarios evaluados. Existe diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) entre el grupo de animales sanos y enfermos.

El análisis cuantitativo del grupo de animales enfermos demuestra la tendencia creciente de expresión de IL10, la cual es detectable a partir del nacimiento, y que alcanza su máxima expresión a la cuarta semana de edad tal cual ha sido descrito para las otras citoquinas evaluadas. La expresión fue de 90.19, 281.58, 302.79, 540.82, 357.24 y 299.22 de la primera a la sexta semana, respectivamente (Figura 22, ANEXO 6). La prueba de ANOVA de una vía señala que existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) dentro de este grupo sanitario. La prueba de Tukey determinó que no existe diferencia en la expresión de IL10 entre la segunda, tercera y sexta semana de vida, mientras que la diferencia está presente entre el resto de grupos y entre éstos con el grupo calibrador (Figura 18). El índice de correlación de Spearman (0.7021) señala una buena correlación positiva entre las variables edad y expresión de IL10, a diferencia de los casos anteriores.



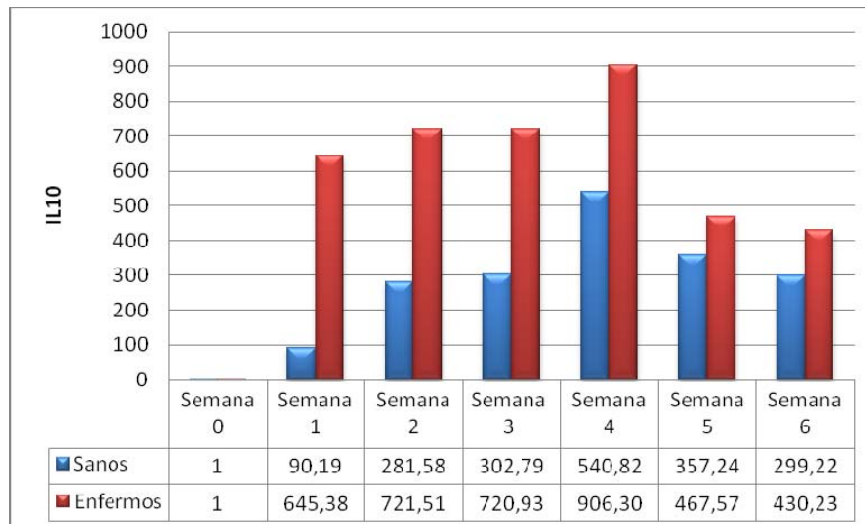
**Figura 22.** Niveles de expresión de IL10 en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas, según edad, con respecto al calibrador. Cada barra representa la media  $\pm$  la SD de los grupos etarios evaluados. Existe diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) entre los grupos. \* $p < 0.05$ , diferencia estadística entre los grupos etarios salvo los grupos de la semana 2, 3 y 6, los que no presentan diferencia significativa entre sí.

En caso de los animales con enteropatía, se observa expresión elevada de IL10 con respecto a los animales sanos y al grupo calibrador. Además, se observa un patrón ascendente hasta la cuarta semana, donde se alcanza el máximo de expresión, y luego hay disminución de expresión hacia la sexta semana. La expresión fue de 645.38, 721.51, 720.93, 906.30, 467.57 y 430.23 desde la primera hasta la sexta semana de edad, respectivamente (Figura 23). La prueba de ANOVA señala la existencia de diferencia significativa entre los grupos etarios y el análisis de Tukey indica que no hay diferencia en la expresión de IL10 entre la primera, segunda y tercera semana de edad; a su vez tampoco existe diferencia entre la quinta y sexta semana. Por ende, se distinguen 3 grupos estadísticamente distintos que corresponden al grupo de 1 a 3 semanas de edad, el grupo ubicado en la cuarta semana de edad y el grupo comprendido entre la quinta y sexta semana de edad, los que a su vez son todos distintos del calibrador. El índice de correlación de Spearman (-0.5052) señala una moderada correlación negativa de las variables edad y expresión de IL10, lo que sustenta la observación de expresión elevada ascendente desde la primera hasta la cuarta semana y consiguiente disminución hacia valores relativos menores a los de la primera semana de edad.



**Figura 23.** Niveles de expresión de IL10 en mucosa intestinal de crías de alpaca enfermas, según edad, con respecto al calibrador. Cada barra representa la media  $\pm$  la SD de los grupos etarios evaluados. Existe diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) entre los grupos. *Los grupos de las semana 1, 2 y 3 no presentan diferencia significativa entre sí. Asimismo, tampoco presentan diferencia el grupo de la semana 5 y 6.*

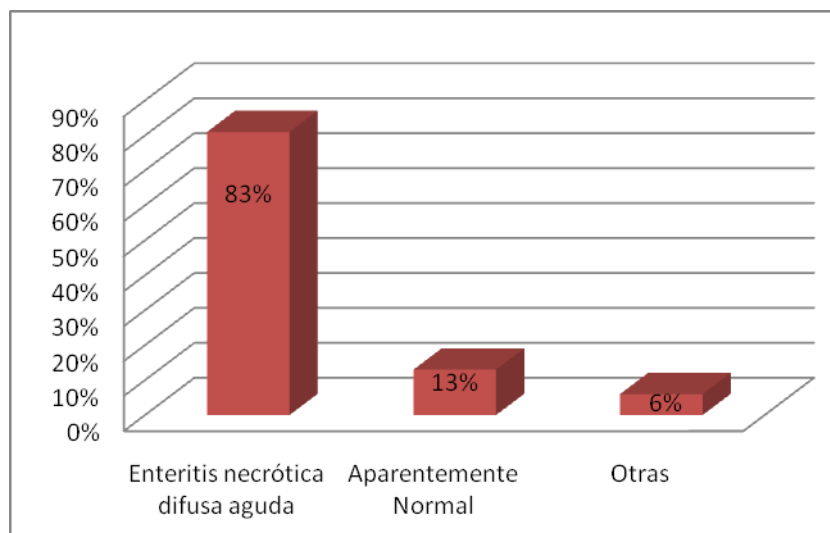
Durante la comparación entre animales sanos y enfermos por edad se encontró que en todos los grupos etarios existe diferencia significativa de acuerdo al estado sanitario ( $p < 0.05$ ), siendo mayor el promedio de expresión de IL10 en animales enfermos. El patrón tipo parábola se mantiene para los animales sanos; aunque la diferencia entre ellos y los enfermos no es tan amplia como la hallada para las demás citoquinas (Figura 24).



**Figura 24.** Niveles de expresión de IL10 en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas y enfermas, según edad, con respecto al calibrador. Cada barra representa la media  $\pm$  la SD de los grupos etarios evaluados. Existe diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) entre los grupos.

#### 4.3.- HISTOPATOLOGÍA

Los resultados del estudio histopatológico determinaron que el 83% de los animales (30/36) mostraron lesiones caracterizadas como enteritis necrótica difusa aguda (en intensidad moderada y severa), el 6% (2/36) mostraron lesiones tipo enteritis catarral y calcificación distrófica, mientras que un 13% (4/36) no mostraron evidencia de lesión alguna (Figura 25). Cabe resaltar que aquellas muestras donde no se encontraron lesiones a nivel de yeyuno si mostraron lesiones en íleon, asociados comúnmente a nidos bacterianos y a hiperplasia linfoide (datos no mostrados). Por tal motivo, se considera que las respuestas elevadas en relación a citoquinas del sistema inmune en yeyuno se relacionan íntimamente con estas lesiones.



**Figura 25.** Frecuencia de lesiones histopatológicas en mucosa intestinal de crías de alpaca enfermas con enteropatía.

La lesión más frecuente (enteritis necrótica difusa aguda) no pudo asociarse a un agente causal de manera específica en 26 animales, logró asociarse a bacterias en 7 animales y a *Cryptosporidium sp* en 3 animales. Cabe mencionar que la clasificación de enteritis necrótica aguda abarca aquellas muestras en la que el patógeno causal no fue evidente; sin embargo, esto pudo estar influenciado por el corte histológico, por el curso o distribución de la infección causante de la enteropatía y no por la ausencia real de bacterias, parásitos u otros agentes.

## V. DISCUSIÓN

El presente estudio tuvo por objetivo identificar la cinética de expresión de ARNm de citoquinas que participan en la respuesta inmune tipo Th1 (IFN $\gamma$  e IL2) y Th2 (IL4 e IL10) en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas y crías con enteropatía caracterizada clínicamente por la presencia activa de diarrea. Tales citoquinas regulan de forma constante el desempeño y funciones de la respuesta inmune frente a determinados agentes infecciosos y no infecciosos, adquiriendo características propias de acuerdo al tipo de agente causal y están íntimamente influenciados por características propias de los individuos para polarizarse hacia respuestas tipo Th1 o Th2 (Wagner y col., 2010).

A la fecha, varios estudios han analizado los niveles de transcripción y expresión de este tipo de citoquinas en varias especies animales como el ratón, el cerdo (Butler y col., 2006), el bovino y el equino (Wagner y col., 2010) a fines de investigación para elucidar el tipo y cinética de la respuesta inmune en condiciones específicas que permitan generar alternativas preventivas o terapéuticas. En los camélidos, se ha estudiado la dinámica de expresión de ARNm de estas citoquinas en especies del viejo mundo (*Camelus dromedarius*, principalmente) y llamas (*Lama pacos*) del Nuevo Mundo en condiciones como vacunación con antígenos de *Brucella abortus*. Esto ha permitido emplear con éxito en este trabajo en alpacas, oligonucleótidos diseñados en camellos (*Camelus bactrianus*) por Odbileg y col (2008). Esto se debe a las relaciones ancestrales existentes entre los camélidos pertenecientes a la misma familia influenciados por eventos de migración y aislamiento (Wheeler, 1995), su crianza en aislamiento y los altos grados de hibridación llama/alpaca que se han propiciado en nuestro medio (Wheeler, 2010). Estas condiciones han permitido que los niveles de identidad entre llamas, alpacas y dromedarios sean altos, alcanzando hasta el 99.6% de identidad entre las secuencias de llama y dromedario en relación a IL-10 (Odbileg y col., 2006)



Aún más, existe un alto grado de conservación de las citoquinas reguladoras de la respuesta inmune en los mamíferos ya que los receptores y factores celulares reclutados para iniciar la transcripción de los genes característicos de cada respuesta se encuentran conservados en las células diana. Por este motivo, los mecanismos de regulación entre las diferentes citoquinas parecen también conservarse entre distintas especies al representar mecanismos evolutivos ancestrales (Bowen y col., 2008).

El estudio ha identificado características cinéticas comunes entre las citoquinas evaluadas, es decir, patrones de cinética similares entre las citoquinas de la respuesta celular (Th1) y humoral (Th2) de la respuesta inmune adaptativa en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas de hasta 45 días de edad. Sin embargo, la intensidad entre ambos tipos de respuesta difiere particularmente en los animales sanos.

Primeramente, y a diferencia de lo encontrado en el caso de IgA (Dionisio, 2012), la expresión de estas citoquinas (tanto para Th1 y Th2) es detectable a partir del primer día de edad aún en animales neonatos que no han consumido calostro. Se sabe que en el caso de IgA son necesarios varios estímulos antigénicos para promover la producción de esta inmunoglobulina a partir de linfocitos B locales. Tales estímulos antigénicos incrementan la producción local de citoquinas de la respuesta celular y humoral adquirida, mas no son necesarias para el inicio per se de la producción ya que los linfocitos CD4<sup>+</sup> (Th) ubicados en lámina propia y Placas de Peyer se encuentran aptos para su expresión aún antes del nacimiento (Porto y col., 2007).

Estos eventos de producción temprana de citoquinas se han demostrado también en los rumiantes (bovinos y ovinos), donde es posible detectar IFN $\gamma$  sérico y en diversos tejidos fetales desde el segundo tercio de gestación, a fin de proteger el feto contra infecciones transmitidas por la madre (Bartley col., 2012). Se ha demostrado que parte de las citoquinas detectadas en estos estudios se transfieren transplacentalmente y que contribuyen con la protección del neonato durante el proceso adaptativo tras parto (Tse y Young, 2011).

La expresión de ARNm de las citoquinas evaluadas de la respuesta Th1 y Th2 se producen de forma ascendente y gradual alcanzando un máximo de expresión entre la tercera y quinta semanas de edad, que luego desciende hacia la sexta semana en los animales sanos. Este patrón se ha repetido con diferentes intensidades en todas las citoquinas evaluadas. Aún más, este mismo patrón es el reportado para citoquinas proinflamatorias (Bardalez, 2012) y péptidos antimicrobianos (More, 2010) componentes de la inmunidad innata, y de Inmunoglobulina A (IgA) (Dionisio, 2012) componente de la inmunidad adquirida, cuantificados en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas.

Estos hallazgos en conjunto sugieren que la regulación abarca a las respuestas tanto del tipo innata como adaptativa y que están influenciados por el mismo tipo de factores y estímulos presentes en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas. Varios estudios señalan que la duración y cinética de las respuestas Th1 y Th2 están íntimamente ligadas al patrón de influjo intracelular de segundos mensajes intracelulares como el calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), el que regula diversos factores transcripcionales según su intensidad de interacción como NF- $\kappa$ B, NFAT y JNK (Dolmetsch y col., 1997). Una fuente importante de este mineral es el calostro y leche materna. La diferenciación entre un linaje y otro depende del repertorio de citoquinas producidas luego de la unión del antígeno con el TCR, además de la enorme influencia particular del patógeno específico, la dosis de antígeno y la base genética del individuo (Tizard, 2009).

Los animales en estudio son crías neonatas en donde los estímulos antigénicos provienen de la colonización bacteriana normal a partir del alimento y funcionan como medio regulatorio de expresión de las citoquinas, conformando un mecanismo modulador localizado no sólo en partículas alimentarias sino también en macromoléculas y factores de crecimiento contenidos en la leche materna. En porcinos, por ejemplo, se ha estudiado intensamente los procesos fisiológicos que implican el cambio de alimento materno hacia alimento seco. En el ámbito silvestre, los animales incrementan la ingesta de alimento seco mientras disminuye gradualmente la ingesta de calostro hasta completar el destete alrededor de la novena semana de edad. Este proceso permite la

exposición gradual y en dosis crecientes de los mismos antígenos, favoreciendo la presentación de tolerancia hacia estos antígenos “inofensivos” mientras se conserva el potencial de respuesta frente a antígenos dañinos y los individuos aun están protegidos por IgA materna (Bailey y col., 2001).

Posteriormente a las cuatro semanas de vida, los procesos adaptativos a la implantación de la microbiota saprófita modulan la expresión de las distintas facetas de la respuesta inmune a fin de mantener la homeostasis intestinal e impedir la prolongación de respuestas desproporcionadas hacia antígenos alimentarios, lo que implica mecanismos de tolerancia y exclusión, como ha sido demostrado en la evaluación de IgA. Las citoquinas y las células que las producen deben orquestarse de manera ordenada y en colaboración con IgA. De lo contrario, suceden fallas inmunes que conllevan a cronicidad, inflamación y alergias (Neurath y col., 2002).

La cinética observada en animales sanos en estudio, sucede de manera conjunta elevándose y disminuyendo la expresión de forma paralela tanto en las citoquinas Th1 como Th2. Esto tiene sustento en el comportamiento en cascada de las citoquinas, donde existen comportamientos de dependencia, sinergismo y hasta temporalidad. Está claro que la regulación de ambos tipos de respuesta (celular y humoral) no son del todo mutuamente excluyentes sino que suelen sucederse casi concomitantemente o uno después de otro, conforme avanza la cascada de respuestas y de acuerdo a la intensidad y duración del estímulo antigénico (Tizard, 2009).

Bajo este aspecto, debe considerarse que las alpacas nacen con una cantidad de gammaglobulina de 1.4mg/ml en suero, la que descende drásticamente a 0.98, 0.76 y 0.79 mg/ml a los 8, 15 y 22 días de edad, respectivamente. Sin embargo, las proteínas totales en suero tienen a aumentar a partir de la tercera semana de edad (Ramírez y col., 1995). Interessantemente, las crías se afectan con enterotoxemia entre los 3 y 80 días de edad, siendo las alpacas de 2 y 3 semanas de edad las más susceptibles a la enfermedad (Bustanza, 2000). En este estudio, los niveles máximos de expresión se alcanzan entre las 3 y 5 semanas de edad,

relacionándose no sólo a factores de los individuos (como lo expuesto líneas arriba) sino también a factores ambientales y de manejo.

Aún más, la presencia de coccidias desde edad temprana (al menos 10 días de edad), que persiste hasta alcanzar la madurez, promoverían asociaciones que tienen efecto sobre el sistema inmune. Los factores asociados al manejo también se relacionan a este patrón de aumento gradual de la expresión de estas citoquinas y al desarrollo de estos patógenos en el medio ambiente. Por ejemplo, época de parición suele coincidir con los períodos de lluvia, los que no sólo favorecen el crecimiento de los pastos, sino también el hacinamiento de los animales con la consiguiente concentración de formas esporuladas de *C. perfringens* y formas infectivas (favorecidas por la humedad y temperatura) de coccidias (Ramírez y col., 1985). No es de sorprender que la combinación de todos los factores anteriormente expuestos promuevan la presentación de la cinética observada, en vista que los primeros 45 días de vida suelen ser críticos en el desarrollo de los animales.

Los niveles altos de expresión de citoquinas encontrados en los animales sanos, alcanzando como máximo niveles de 1096 y 315 veces lo expresado por los animales recién nacidos que no han consumido calostro en el caso de IFN $\gamma$  e IL4 respectivamente, deben ser tomados con cuidado y teniendo en cuenta el experimento en cuestión. Para la cuantificación de citoquinas suelen emplearse preparaciones de células linfoides de bazo estimulados con lectinas (ConA o PMN) y se ha encontrado que bajo estas condiciones se alcanzan promedios de 150 veces la expresión del control celular de ratón en el caso de IL4, mientras que llega a 2500 veces cuando las mismas células son estimuladas con anticuerpos policlonales (Baguet y col., 2005). Por otro lado, cuando se emplean antígenos sobre células T $\gamma\delta$  estimuladas con antígenos bacterianos como *F. novicida* se ha encontrado que la expresión de IFN- $\beta$  alcanza hasta mil veces el control no infectado a las 48 horas post inoculación (Henry y col., 2010). No es de extrañar que en condiciones normales, como las encontradas en este estudio, los niveles de transcripción alcancen niveles de hasta 1000 veces la expresión del calibrador, teniendo en cuenta que la cantidad de células presentes

en yeyuno supera en mucho cualquier experimento que requiera de agentes promitóticos como los descritos líneas arriba.

Las relaciones en cuanto a intensidad de la expresión tienden a acentuarse conforme haya predominancia de citoquinas específicas favoreciendo un tipo de respuesta adaptativa en un momento dado. En este estudio los niveles de expresión de IFN $\gamma$  (tipo Th1) son mayores a su antagonista IL4 (Th2) en todos los grupos etarios en los animales sanos, sugiriendo la polarización de la cinética hacia el fenotipo Th1 en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas de hasta 45 días de edad.

Este tipo de polarización temprana se ha observado también en células mononucleares circulantes en potrillos de 6 a 12 semanas de edad, donde el ratio IFN $\gamma$ /IL4 es alto y demuestra un claro retraso en las respuestas tipo Th2 con predominancia de respuestas Th1. Asimismo, los potrillos de 5 días de edad tienen niveles altos y similares de IFN $\gamma$  en comparación con animales adultos, niveles relativamente bajos de IL4 y una relación constante de IFN $\gamma$ /IL10 que demuestra una regulación madura entre ambas respuestas, observaciones que también se han demostrado en este estudio. Tal comportamiento explica, en el caso de equinos, la falla en la vacunación contra determinados patógenos y la pobre respuesta Th2 contra infecciones parasitarias (Wagner y col., 2010), eventos también observados en camélidos sudamericanos. Debe considerarse a su vez, que existe más de un tipo celular capaz de producir IFN- $\gamma$ , por ejemplo, las células NK. Sin embargo, esta citoquina se produce en mayor cantidad por las células Th1, las que a su vez se encuentran en mayor proporción en tejido intestinal tanto en linfocitos intraepiteliales como en placas de Peyer (Tizard, 2009). De todas formas, y debido a que el estudio toma en cuenta todo el tejido yeyunal, el balance en la producción de todas las citoquinas proviene de la interacción de todos los tipos celulares capaces de producir las citoquinas evaluadas en el tejido muestreado.

Sin embargo, no puede demostrarse tal efecto sin necesidad de cuantificar las proteínas finales, esto porque ciertas células son más sensibles a determinadas

citoquinas, lo que fomentaría su actividad en presencia de cantidades moderadas de la citoquina y disponibilidad de receptores. A diferencia de lo encontrado en equinos y en este estudio hecho en crías de alpacas, los ratones neonatos suelen tener predominancia por respuestas tipo Th2 (García y col., 2000) mientras que los humanos neonatos suelen tener predominancia por respuestas Th1 o Th0. Es por ello necesario complementar los estudios con herramientas que asocien ARNm con proteínas maduras y células específicas a fin de demostrar si en efecto existe tal polarización (Marchant y col., 1999). Además, algunas citoquinas como la IL4, no guardan correlación entre la expresión de ARNm y la cantidad de proteína funcional final en situaciones específicas debido a la síntesis de proteínas solubles (Tykocinski y col., 2005).

Aún más a lo anteriormente expuesto, los camélidos sudamericanos al igual que el resto de los miembros del orden *Artiodactyla* poseen mayor cantidad de células  $T\gamma\delta$  en sangre periférica (en bovinos equivalen a más del 50% de la población linfoide circulante) (Ahn y col., 2002), y en intestino delgado (representan más del 50% de linfocitos intraepiteliales en rumiantes) mientras que en humanos representan sólo del 5 al 15% (Kagnoff, 1998). Este tipo de células pueden discriminar distintos antígenos y participar de las respuestas inmunes primarias e iniciales en mucosas al producir citoquinas asociadas a las respuestas Th1 o Th2 antes que entren en acción los linfocitos CD4(+) y CD8(+) además de no estar restringidos a un tipo específico de molécula MHC (Ferrick y col., 1995). Su repertorio es variado durante la etapa fetal y vida temprana de los mamíferos, lo que supone una actividad en la inmunidad de mucosas, mientras la inmunidad específica adquirida y mediada por linfocitos  $T\alpha\beta$  e Inmunoglobulina A no se encuentran desarrolladas en su totalidad (Kagnoff, 1998). Estas células son entonces fuente importante de citoquinas propias de las respuestas tanto Th1 o Th2 (según reconocimiento de distintos antígenos) en ausencia de actividad de linfocitos convencionales CD4(+) en la etapa fetal y durante la vida temprana de los mamíferos.

En camélidos, se ha demostrado que éstos pertenecen al tipo de vertebrados con expresión  $T\gamma\delta$  alta debido a la identificación de la molécula WC1, la que

también ha sido identificada en otros rumiantes ya que aparentemente es una subpoblación que ha evolucionado en Artiodactilos (Bautista, 2011).

Hemos demostrado que la expresión de IL2 en mucosa intestinal de alpacas sanas hasta los 45 días de edad es muy pobre. Esto concuerda con respuestas observadas en neonatos humanos, donde la estimulación antigénica a través de TCR no logra incrementar notablemente su expresión. Sin embargo; una estimulación antigénica independiente del TCR ha servido para mejorar la respuesta y se emplea como estrategia de vacunación (Adkins, 1999). En humanos, porcinos y roedores se ha demostrado que tras la activación de linfocitos intraepiteliales, éstos tienen preferencia por la expresión de IL4, en lugar de producción de IL2 que se produce pobremente en mucosa intestinal. Esto se debe a alteración de elementos transcripcionales y vías señalizadoras intracelulares (Boirivant y col., 1996).

Por su parte, los niveles de IL10 observados en este estudio se relacionan íntimamente con el desarrollo físico de la mucosa intestinal, ergo la edad de los animales. Por tal motivo su coeficiente de correlación positivo se considera bueno ( $S=0.7021$ ), manteniendo un patrón en parábola y una relación con IFN $\gamma$  constante. La síntesis de IL10 tiene este tipo de comportamiento en la mayoría de especies estudiadas debido a su función eminentemente inmunoreguladora, que es esencial para la inducción de tolerancia hacia antígenos alimentarios a través de respuestas supresoras de células T (Neurath y col., 2002).

En todas las citoquinas evaluadas, la expresión promedio de los animales con enteropatía siempre fue mayor que la expresión en animales sanos. Esto puede ser atribuido a la respuesta local normal hacia los antígenos patógenos de los animales enfermos. La conformación de tales antígenos estimula en grandes cantidades la expresión de varios tipos celulares y varios tipos de citoquinas, respectivamente. El tipo e intensidad de expresión de las citoquinas depende del tipo de antígeno, ubicación del evento nocivo y el tipo de linfocito al cual el antígeno es presentado, además de otros factores relacionados a los individuos. A tales efectos se les reconoce por presentar desbalance entre las respuestas Th1

y Th2, favoreciendo un tipo de respuesta que pudiera o no ser favorable para el crecimiento y desarrollo microbiano (Souza y col., 2008), en este caso predominancia de la respuesta Th1 por razones discutidas líneas arriba.

Sin embargo, no puede considerarse una verdadera dinámica de la respuesta tipo Th1 o Th2 a partir de los resultados de este estudio en el caso de los animales enfermos con enteropatía, afectados naturalmente, en donde generalmente los daños son consecuencias de múltiples agentes patógenos. No fue posible ajustar las condiciones experimentales para ejecutar un estudio prospectivo que involucrara la infección experimental con agentes patógenos específicos e individuales en períodos de tiempo establecidos. Tal escenario hubiera permitido evaluar el tipo y forma de cinética de las respuestas Th1 y Th2 bajo patógenos definidos y en periodos experimentales conocidos. El estudio ejecutado se aproximó mas a un estudio retrospectivo al muestrearse animales con signos clínicos de enfermedad entérica (de la cual no fue posible conocer el momento de infección) y en muchos casos no fue posible determinar el agente causal más si la lesión involucrada.

En todos los casos, está bastante claro que la expresión de las citoquinas se encuentra elevada cuando los animales presentan ya signos de enteritis; aunque su “cinética” no responde a un patrón específico y sólo concuerda con los animales aparentemente sanos en el hecho de que la mayor expresión se observa generalmente alrededor de la cuarta semana de edad. Esta falta de patrón de expresión entre las edades está apoyada por una correlación positivas débiles (IL2 e IL4) o negativas (IFN $\gamma$  e IL10). Esto es contrario a lo observado en los animales sanos, donde se observan correlación positiva entre edad y expresión de citoquinas, que van de débiles a moderadas retratando la estructura dinámica relacionada a la edad de los animales. Esto último es particularmente cierto en el caso de IL10 (S= 0.70) e IFN $\gamma$  (S=0.49), las que precisamente polarizan las respuestas inmunes. Es ya sabido que estas dos citoquinas se inhiben mutuamente, aunque la ausencia de una no impida la regulación de la otra tal cual ha sido demostrado para IL4 en relación a IFN $\gamma$ . Esto se debe a que el mecanismo de transcripción de la respuesta Th2, regulado por GATA3, no solo



aumenta la expresión de IL4 sino que inhibe la expresión de IFN $\gamma$  a través del bloqueo de IL12 (Yagi y col., 2010).

En todas las citoquinas evaluadas se observaron variaciones con respecto a las temperaturas de disociación de los productos amplificados. Si bien los productos fueron corroborados a través de electroforesis en agarosa, demostrándose que la longitud de los mismos era la esperada, se notaron variaciones de los valores de T<sub>m</sub> que implicaban la presencia de productos con temperaturas de disociación más altas o más bajas en un porcentaje minoritario en los animales tanto sanos como con signos con enteropatía.

En el caso de las citoquinas tipo Th1 el producto predominante en animales sanos es de menor temperatura que en los animales enfermos, mientras que en las citoquinas Th2 parecen distribuirse equitativamente entre el producto predominante y uno de más baja temperatura. Las variaciones de temperatura son eventos comunes durante la detección de la amplificación en tiempo real ya que el registro de datos es sensible a diversos factores que influyen directamente en la temperatura de disociación final del producto. Tales factores incluyen los equipos, agua, reactivos e incluso materiales descartables como plásticos (Bustin, 2002).

Haciendo de lado los aspectos técnicos, estas variaciones también responden a 2 factores principales: longitud (en pares base) y composición de bases GC del producto. Debido a la constancia de la aparición de los diferentes productos y de su observación en gel de agarosa, podría tratarse de variaciones en la composición de bases (proporción de GC y AT) en las muestras, cuyo origen podría tener una relación geográfica, relacionarse a grupos familiares o tratarse de polimorfismos surgidos por mecanismos fisiológicos como el “splicing” alternativo o generación de SNP. Estos últimos representan modificaciones de un solo nucleótido en regiones determinadas del gen codificante que bien pueden resultar en un cambio aminoacídico funcional o permanecer silentes sin cambio en la estructura o función (Checa, 2007).

El presente estudio no puede establecer con certeza la existencia de polimorfismos o isoformas de ARNm de alguna de las citoquinas evaluadas en alpacas; esto solo sería posible mediante el secuenciamiento nucleotídico de los productos del RT-PCR tiempo real y análisis funcionales de tales variaciones. El estudio no busca identificar tales variaciones o sus consecuencias funcionales sobre infecciones determinadas, sino más bien elucidar la cinética normal en crías de alpaca. Para identificar el origen certero de tales variaciones es necesario acudir a herramientas moleculares sofisticadas como el secuenciamiento génico en grupos más amplios de animales que impliquen no sólo número sino también espacios geográficos amplios. Estas herramientas permitirían develar la verdadera naturaleza de estas variaciones (de Tm) y asignarles cambios funcionales específicos, si los hubiera (Jergens y col, 2009).

Hay probabilidad baja que se hayan cuantificado formas de ARNm inmaduro o pre-ARNm, llamado también ARNm precursor, debido a que tales formas suelen tener diversos tamaños en longitud pares base (pb) al contener aún intrones, carecen de modificaciones tales como colas poliadeniladas y por ello tienen una vida media mucho menor que el ARNm maduro y se encuentran confinadas al núcleo celular (Sánchez y Mitnacht, 2008). Tales formas hubieran sido visibles en los geles de agarosa realizados sobre los productos finales como bandas múltiples (más de una banda) de diferentes tamaños, a diferencia de ARNm maduro el cual siempre es de una misma longitud y se expresa como una banda única. Sin embargo, todos los geles evaluados demuestran un solo producto de tamaño compatible con el cDNA de ARNm secuenciado por Odbileg y col (2006 y 2008), descartando esta posibilidad.

Existen proporciones variables de animales donde no es posible detectar productos amplificados, especialmente en animales enfermos. En el caso de IL-2, se alcanza hasta el 21% de animales con enteropatía sin expresión de esta citoquina. La falta de expresión de las citoquinas o su expresión en niveles indetectables a través de las técnicas moleculares en estas proporciones, con particular énfasis en los animales enfermos, se relaciona a la lesión de enteritis necrótica hallada en el tejido intestinal muestreado. Esta lesión implica la

destrucción de células productoras de las diversas citoquinas así como aquellas células que poseen receptores apropiados para ellas. Por otro lado, y debido a la destrucción del tejido, muchas moléculas como proteínas y ARN quedan libres en el lumen intestinal siendo evacuados a través de la diarrea; aunque las citoquinas de actividad paracrina y autocrina se encuentran muy poco tiempo expuestas, uniéndose rápidamente a sus receptores celulares o por el contrario secretadas en forma soluble perdiéndose con la materia fecal. Este evento dificulta la cuantificación de citoquinas maduras funcionales de forma fehaciente y repetible (Tizard, 2009).

Se observa también una falta de expresión de citoquinas reguladoras de respuesta Th2 como IL4 (24% en animales enfermos y 14% en sanos) y IL10 (18% en animales enfermos y 17% en animales sanos), indicando alteraciones de la expresión de inmunoglobulinas en las mucosas en este porcentaje de crías. Dionisio (2012) reportó una proporción de 25% (10/40) en sanos y 30% (11/37) en animales enfermos donde no fue posible detectar ARNm del exón 1 de la IgA en la mucosa intestinal de las crías de alpacas de la misma edad de este estudio y utilizando la RT PCR tiempo real; lo que indica una relación directa entre ambos eventos. Esta disregulación inmune podría ser un factor de riesgo para la presentación de enteropatías en las crías de alpacas, como se observa en el campo durante las campañas de parición.

Similar a lo reportado por Palacios y col (2005), el análisis histopatológico realizado en yeyuno de las alpacas enfermas del presente estudio demuestra que la enteritis necrótica difusa aguda es la lesión predominante en el grupo de animales enfermos. Esto se debería a que la enterotoxemia, una causa principal de mortalidad en crías de alpaca, se caracteriza por producir necrosis a lo largo del intestino delgado y grueso; a su vez otras enteropatías prevalentes como la colibacilosis, eimeriosis y criptosporidiosis son capaces de generar dicha lesión dependiendo del grado de infección y estadio de éste (Maturrano y col, 2010). Es decir, el tejido intestinal es proclive a las lesiones necróticas ante variedad de estímulos, hecho que sólo agrava los signos clínicos, costos de tratamiento y tasas de supervivencia.

Es necesario hacer más estudios con respecto a la inmunidad de mucosas en crías de alpaca debido a que éstas son susceptibles a microorganismos infecciosos que atacan con particularidad el tracto respiratorio y digestivo. Tales cuadros ocasionan serias pérdidas económicas debido a mortalidad y morbilidad de los animales afectados. Estudios que develen el funcionamiento del sistema inmune de mucosas contribuyen a la generación de conocimiento necesario para diseñar estrategias terapéuticas y preventivas y a cuantificar sus efectos en los animales susceptibles. Por tal motivo, es de importancia elucidar detalles con respecto a las respuestas Th1 y Th2 en relación a patógenos específicos de importancia en sanidad de camélidos sudamericanos tales como *C.perfringens* y *Eimeria spp.*, bajo condiciones experimentales y de campo.

## **VI. CONCLUSIONES**

1. Las citoquinas características de las respuestas Th1 (IFN $\gamma$ , IL2) y Th2 (IL4 y IL10) se expresan desde el nacimiento y en forma ascendente y gradual hasta la quinta semana de edad en animales sanos.
2. Los animales enfermos expresan siempre mayor cantidad relativa de citoquinas, tanto las pertenecientes a las respuestas Th1 como Th2, en relación a los animales recién nacidos que no han consumido calostro y a los animales sanos.
3. Se encontró evidencia molecular de una posible polarización de la respuesta inmune de mucosa intestinal hacia el fenotipo Th1, tal cual ha sido demostrado en otras especies animales de corta edad.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas AK, Lichtman AH. 2003. Cellular and molecular immunology. 5ta Edición. WB Saunders Co.
2. Adachi S, Rothenberg EV. 2005. Cell-type-specific epigenetic marking of the IL2 gene at a distal cis-regulatory region in competent, nontranscribing T-cells. *Nucleic acids research*, 33(10):3200-10.
3. Adkins B. 1999. T-cell functions in newborn mice and humans. *Immunol. Today*, 20:330–335.
4. Ahn JS, Konno A, Gebe JA, Aruffo A, Hamilton MJ, Park YH, Davis WC. 2002. Scavenger receptor cysteine-rich domains 9 and 11 of WC1 are receptors for the WC1 counter receptor. *J. Leukoc. Biol.*, 72: 382- 390.
5. Aldridge AJ. 2002. Role of the neutrophil in septic shock and the adult respiratory distress syndrome. *Eur J Surg*, 168:204–214.
6. Ameghino E, De Martini J. 1991. Mortalidad en crías de alpacas. Boletín de Divulgación del Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura (IVITA). UNMSM. Lima. 71 p.
7. Asai, K., Hiki, N., Mimura, Y., Ogawa, T., Unou, K., Kaminishi, M. 2001. Gender differences in cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells: role of estrogen in modulating LOD-induced cytokine secretion in an ex vivo septic model. *Shock*, 16: 340–343.
8. Astermark J, Oldenburg J, Pavlova A, Berntorp E, Lefvert A-K. 2006. Polymorphisms in the IL10 but not in the IL1beta and IL4 genes are associated with inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood*, 107(8):3167-72.
9. Baguet A, Sun X, Arroll T, Krumm A, Bix M. 2005. Intergenic transcription is not required in Th2 cells to maintain histone acetylation and transcriptional permissiveness at the IL4 – IL13 locus. *J Immunol*, 175: 8146-8153.

10. Bailey M, Plunkett FJ, Rothkötter HJ, Vega-Lopez MA, Haverson K, and C. R. Stokes. 2001. Regulation of mucosal immune responses in effector sites. *Proceedings of the Nutrition Society*, 60: 427–435.
11. Bardález CV. 2012. Cinética de expresión del Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e Interleucina 1 alfa (IL-1 $\alpha$ ) en mucosa intestinal de crías de alpaca (*Vicugna pacos*) sanas y con enteropatía. Tesis para optar por el título de médico veterinario. Universidad Nacional Mayor de San Marcos – Facultad de Medicina Veterinaria. Lima, Perú.
12. Bartley PM, Wright SE, Maley SW, Macaldowie CN, Nath M, Hamilton CM, Katzer F, Buxton D, Innes EA. 2012. Maternal and foetal immune responses of cattle following an experimental challenge with *Neospora caninum* at day 70 of gestation. *Veterinary Research*, 43:38.
13. Bautista CR. 2011. Importancia de los Linfocitos T $\gamma\delta$  en la respuesta inmunitaria de los bovinos. *Vet. Méx.*, 42: 65 – 75.
14. Benson MJ, Pino-lagos K, Roseblatt M, Noelle RJ. 2007. All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth , differentiation , and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *JEM*, 204(8):1765-1774.
15. Berin MC, Yang P, Ciok L, Wasserman S, Perdue MH. 1999. Role for IL-4 in macromolecular transport across human intestinal epithelium of permeability. *Am J Physiol Cell Physiol*, 276:1046-1052.
16. Blackwell CC, Moscovis SM, Gordon AE, Al Madami OM, Hall ST, Gleeson M, Scott RJ, Roberts-Thomson J, Weir DM, Busuttill A. 2005. Cytokine responses and sudden infant death syndrome□: genetic , developmental , and environmental risk factors. *Journal of Leukocyte Biology*, 78: 1242- 1254.
17. Boirivant M, Fuss I, Fiocchi C, Klein JS, Strong SA and Strober W. 1996a. Hypoproliferative human lamina propria T-cells retain the capacity to secrete lymphokines when stimulated via CD2/CD28 pathways. *Proceedings of the Association of American Physicians*, 108: 55–67.
18. Bowen H, Kelly A, Lee T, Lavender P. 2008. Control of cytokine gene transcription in Th1 and Th2 cells. *Clinical and Experimental Allergy*, 38 (9): 1422-1431.

19. Boyman O, Sprent J. 2012. The role of interleukin - 2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nature Publishing Group.*, 12(3):180-190. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3156>.
20. Budak F, Goral G, Heper Y., Yilmaz E., Aymak F., Bas-turk B., Tore O., Ener B., Oral H.B. 2007. IL-10 and IL-6 gene polymorphisms as potential host susceptibility factors in Brucellosis. *Cytokine*, 38: 32–36.
21. Bustin SA. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*, 29: 23–39.
22. Bustinza JA. 2000. Enfermedades de la alpaca. 2da ed. P 30-43. Universidad Nacional del Altiplano. Arequipa – Perú.
23. Butler JE, Sinkora M, Wertz N, Holtmeier W, Lemke CD. 2006. Development of the neonatal B and T Cell repertoire in swine: implications for comparative and veterinary immunology. *Vet. Res*, 37: 417-441.
24. Byers SR, Snekvik KR, Righter DJ, Evermann JF, Bradway DS, Parish SM, Barrington GM. 2009. Disseminated *Bovine Viral Diarrhea Virus* in a Persistently Infected Alpaca (*Vicugna Pacos*) Cria. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 21: 145- 148.
25. Castagliuolo I, Karalis K, Valenick L, Pasha A, Nikulasson S, Wlk M, Pothoulakis C. 2001. Endogenous corticosteroids modulate *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 280: 539- 545.
26. Cebra J, Periwal S, Lee G, Lee F, Shroff K. 1998. Development and maintenance of the gut-associated lymphoid tissue (GALT): the roles of enteric bacteria and viruses. *Dev Immunol* 6 (Suppl. 1-2):13-8.
27. Checa M. 2007. Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*, 20(3):213-221.
28. Cid, M. 2010. Sanidad de alpacas en la etapa neonatal. 1ª ed. Madrid: Editorial Complutense. 148 p.



29. Cid M, Martín C. 2010. Diarreas neonatales en alpacas. En: Cid, M. Sanidad de alpacas en la etapa neonatal. 1ª ed. Madrid: Editorial Complutense. 148 p.
30. Collier CT, Hofacre CL, Payne AM, Anderson DB, Kaiser P. 2008. Coccidia-induced mucogenesis promotes the onset of necrotic enteritis by supporting *Clostridium perfringens* growth. *Veterinary Immunology and Immunopathology*; 122: 104-115.
31. Cominelli F. 2004. Cytokine-based therapies for Crohn's disease—new paradigms. *N Engl J Med*, 351:2045–2048.
32. Coussens PM. 2004. Model for Immune Responses to *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* in Cattle. *Infect. Immun.*, 72(6): 3089-3096.
33. Daley-Bauer LP, Purdy SR, Smith MC, Gagliardo LF, Davis WC, Appleton JA. 2010. Contributions of conventional and heavy-chain IgG to immunity in fetal, neonatal, and adult alpacas. *Clinical and vaccine immunology*, 17(12):2007- 2015.
34. Dinarello C.A. 2005. Blocking IL-1 in systemic inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, 2: 1355–1359.
35. Dionisio JC. 2012. Cinética de expresión de la inmunoglobulina A en el epitelio intestinal de crías de alpaca (*Vicugna pacos*). Tesis para optar por el título de médico veterinario. Universidad Nacional Mayor de San Marcos – Facultad de Medicina Veterinaria. Lima, Perú.
36. Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC, Healy JI. 1997. Differential activation of transcription factors induced by Ca<sup>2+</sup> response amplitude and duration. *Nature*, 386: 759-760.
37. Eckmann L, Kagnoff MF, Fierer J. 1993. Epithelial Cells Secrete the Chemokine Interleukin-8 in Response to Bacterial Entry. *Infection and Immunity*, 61(11):4569-4574.
38. El-Boshy M, Abbas H, El-Khodery, Osman S. 2009. Cytokine response and clinicopathological findings in *Brucella* infected camels (*Camelus dromedarius*). *Veterinarni Medicina*, 54(1): 25–32.

39. Elizondo AM, Marcoppido G, Parren V. 2004. Isolation of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* from a South American Camelid (*Lama guanicoe*) with Diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(10):4809-4811.
40. Erdogan S., Celik S., Aslantas O., Kontas T., Ocak S. 2007. Elevated cAMP levels reverse *Brucella melitensis* induced lipid peroxidation and stimulate IL-10 transcription in rats. *Research in Veterinary Science*, 82: 181–186.
41. Fernández-Baca S. 2005. Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina TCP/RLA/2914.FAO
42. Ferrick DA, Schrenzel MD, Mulvania T, HsiehB, Ferlin WG, Lepper H. 1995. Differential production of interferon- $\gamma$  and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by  $\gamma\delta$  T cells *in vivo*. *Nature*, 373: 255 – 257.
43. Fleming PJ, Blair PS, Platt WM, Tripp J, Smith, IJ. 2003. Sudden infant death syndrome and social deprivation: assessing epidemiological factors after post-matching deprivation. *Paediatr. Perinat. Epidemiol.* 17: 272–280.
44. Fowler ME. 1998. Medicine and surgery of South American camelids. 2<sup>a</sup> ed. Iowa: Iowa State University Press. P 166-169.
45. Froen, JF, Akre H, Stray-Pedersen B, Saugstad OD. 2000. Adverse effects of nicotine and interleukin-1 $\alpha$  on autoresuscitation after apnea in piglets: implications for sudden infant death syndrome. *Pediatrics* 105, E52.
46. Garcia A.M., Fadel S.A., Cao S., Sarcotti M. 2000. T cell immunity in neonates. *Immunol. Res.*, 22:177–190.
47. Garmendia A, Palmer G, DeMartini JC, McGuire T. 1987. Failure of passive immunoglobulin transfer. A major determinant of mortality in newborn alpacas *Lama pacos*. *American Journal of Veterinary Research* 49(10): 1472-1476.

48. Genova SG, Streeter RN, Simpson KM, Kapil S. 2008. Detection of an antigenic group 2 coronavirus in an adult alpaca with enteritis. *Clinical and vaccine immunology*, 15(10): 1629-1632.
49. Gillan S, Brien RO, Hughes AD, Griffin JFT. 2010. Identification of Immune Parameters To Differentiate Disease States among Sheep Infected with *Mycobacterium avium*. *Clinical and vaccine immunology*, 17(1):108-117.
50. Guarner F. 2007. Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad. *Nutr Hosp* 22(Suppl. 2):14-9.
51. Guo L, Urban JF, Zhu J, William E. 2002. Elevating Calcium in Th2 Cells Activates Multiple Pathways to Induce IL-4 Transcription and mRNA Stabilization. *The Journal of Immunology*, 181: 3984-3993.
52. Hayashi T, Ishida Y, Kimura A, Ywakura Y, Mukaida N, Kondo T. 2007. IFN-  $\gamma$  Protects Cerulein-Induced Acute Pancreatitis by Repressing NF-  $\kappa$ B Activation 1. *The Journal of Immunology*, 178 (17): 7385-7394.
53. Hegazy A.A., El Dughaym A., Alaknah M., Housawi F.M.T., Hatem M.E. 2004. Studies on mastitis in female camel with special reference to brucellosis. *Journal of Camel Science*, 1: 96–102.
54. Heidemann J, R  ther C, Kebschull M, Domschke W, Bruwer M, Koch S, Kucharzic T, Maaser C. 2007. Expression of IL-12-related molecules in human intestinal microvascular endothelial cells is regulated by TLR3. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 293(6): 1315- 1324.
55. Henry T, Kirimanjeswara GS, Ruby T, Jones JW, Peng K, Perret M, Ho L, Sauer JD, Iwakura J, Metzger DW, Monack DM. 2010. Type I IFN signaling constraints IL17A/F Secretion by  $\gamma\delta$ T Cells during Bacterial infections. *J Immunol*, 184: 3755-3767.
56. Huber JP, Ramos HJ, Gill M, Farrar JD. 2010. Cutting edge: Type I IFN reverses human Th2 commitment and stability by suppressing GATA3. *Journal of immunology*, 185(2):813-817.
57. Huggett J, Dheda k, Bustin S, Zumla A. 2005. Real Time RT-PCR Normalisation; strategies and considerations. *Genes and immunity*, 6: 279 – 284.

58. Iwata M, Hirakiyama A, Eshima Y, Kageshika H, Kato Ch, Song S. 2004. Retinoic Acid Imprints Gut-Homing Specificity on T Cells. *Immunity*, 21:527-538.
59. Jergens A, Sonea I, O'Connor A, Kauffman L, Grozdanic S, Ackermann M, Evans R. 2009. Intestinal Cytokine mRNA Expression in Canine Inflammatory Bowel Disease: A Meta-Analysis with Critical Appraisal. *Comp Med.*, 59(2): 153–162.
60. Jones MA, To S, Maskell DJ, Bryant CE, Barrow PA. 2003. Induction of Proinflammatory Responses in the Human Monocytic Cell Line THP-1 by *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity*, 71(5):2626-2633.
61. Kadwell M, Fernandez M, Stanley HF, Baldi R, Wheeler JC, Rosadio R, Bruford MW. 2001. Genetic analysis reveals the wild ancestors of the llama and the alpaca. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society.*, 268(1485): 2575-2584.
62. Kagnoff MF. 1998. Ontogeny and function of  $\gamma\delta$  T cells in the intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 274:455-458.
63. Kalies K, König P, Zhang Y-ming, Deierling M, Barthelman J, Stamm C, Westermann J. 2008. Nonoverlapping Expression of IL10, IL12p40, and IFN mRNA in the Marginal Zone and T Cell Zone of the Spleen after Antigenic Stimulation. *The Journal of Immunology*, 180: 5457–5465.
64. Kenefick KB, Adams KL, Steinberg H, Czuprynski CJ. 1994. In vivo administration of a monoclonal antibody against the type I IL-1 receptor inhibits the ability of mice to eliminate *Mycobacterium paratuberculosis*. *Journal of Leukocyte Biology*, 55: 719-722.
65. Keyburn, AL, Boyce JD, Vaz P, Bannam TL, Ford ME, Parker D, Di Rubbo A, Rood JJ, and Moore RJ. 2009. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *Clinical and Vaccine immunology*, 16(11): 1639-1647.
66. Knoferl MW, Jarrar D, Schwacha MG, Angele MK, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH. 2000. Severe hypoxemia in the absence of blood loss causes a gender dimorphic immune response. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 279: 2004–2010.
67. Koller FL, Hwang DG, Dozier EA, Fingleton B. 2010. Epithelial interleukin-4 receptor expression promotes colon tumor growth. *Carcinogenesis*, 1(6):1010-1017.

68. Kurreeman FS, Schonkeren JM, Heijmans BT, Toes REM, Huizinga TWJ. 2004. Transcription of the IL10 gene reveals allele-specific regulation at the mRNA level. *Human molecular genetics*, 13(16):1755- 1762.
69. Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  Method. *Methods*, 25: 402-408.
70. Long KZ, Rosado JL, Santos JI, Haas M, Al Mamun A, DuPont H, Nanthakumar NN, Estrada García T. 2010. Associations between mucosal innate and adaptive immune responses and resolution of diarrheal pathogen infections. *Infection and immunity*, 78(3): 1221-8.
71. Lu Y, Sarson AJ, Gong J, Zhou H, Zhu W, Kang Z, Yu H, Sharif S, Han Y. 2009. Expression profiles of genes in Toll-like receptor-mediated signaling of broilers infected with *Clostridium perfringens*. *Clinical and vaccine immunology*, 16(11):1639-1647.
72. Lykens JE, Terrell CE, Zoller EE, Divanovic S, Trompette A, Karp CL, Aliberti J, Flick MJ, Jordan MB. 2010. Mice with a Selective Impairment of IFN $\gamma$  Signaling in Macrophage Lineage Cells Demonstrate the Critical Role of IFN $\gamma$ -Activated Macrophages for the Control of Protozoan Parasitic Infections In Vivo. *The Journal of Immunology*, 184: 877-885.
73. Malek TR, Yu A, Vincek V, Scibelli P, Kong L. 2002. CD4 Regulatory T Cells Prevent Lethal Autoimmunity in IL-2R Deficient Mice: Implications for the Nonredundant Function of IL-2. *Autoimmunity*. 17:167-178.
74. Marchant A., Goetghebuer T., Ota MO, Wolfe I, Ceesay SJ, De Groote D. 1999. Newborns develop a Th1-type immune response to Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Gue´rin vaccination. *J. Immunol.*, 163:2249–2255.
75. Martin C, Pinto C, Cid M. 2010. Camélidos sudamericanos: estado sanitario de sus crías. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 4(1): 37-50.
76. Martins GA, Cimmino L, Liao J, Magnusdottir E, Calame K. 2008. Blimp-1 directly represses Il2 and the Il2 activator Fos, attenuating T cell proliferation and survival. *The Journal of experimental medicine*, 205(9):1959-65.

77. Maturrano L, Perez D, Rosadio R. 2010. Enterotoxemia de las alpacas. En: Cid, M. Sanidad de alpacas en la etapa neonatal. 1ª ed. Madrid: Editorial Complutense. 148 p.
78. Maynard CL, Hatton RD, Helms WS, Oliver JR, Stephensen CB, Weaver CT. 2009. Contrasting roles for all-trans retinoic acid in TGF-beta-mediated induction of Foxp3 and Il10 genes in developing regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine*, 206(2):343-357.
79. McKarns SC, Schwartz RH. 2008. Biphasic regulation of IL2 transcription in CD4+ T Cells: Roles for TNF-  $\alpha$  Receptor Signaling and Chromatin Structure. *The Journal of Immunology*, 181: 1272-1281.
80. Meijssen MAC, Brandwein SL, Reinecker HC, Bhan AK, Podolsky DK. 1998. Alteration of gene expression by intestinal epithelial cells precedes colitis in interleukin-2-deficient mice splice forms Alteration of gene expression by intestinal epithelial cells precedes colitis in interleukin-2-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 274:472-479.
81. Mercado EC, Rodríguez SM, Elizondo AM, Marcoppido G, Parreño V. 2004. Isolation of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli from a South American Camelid (*Lama guanicoe*) with Diarrhea. *Journal of clinical Microbiology*, 42(10):4809-4811.
82. Moran GW, Leslie FC, Levison SE, Worthington J, McLaughlin JT. 2008. Enteroendocrine cells: neglected players in gastrointestinal disorders? *Therapeutic advances in gastroenterology*, 1:51-60.
83. More JA. 2010. Detección genómica y expresión de péptidos antimicrobianos ( $\alpha$  y  $\beta$  defensinas) en mucosa intestinal de crías de alpaca. Tesis para optar por el título de médico veterinario. Universidad Nacional Mayor de San Marcos – Facultad de Medicina Veterinaria. Lima, Perú.
84. Neurath MF, Finotto S, Glimcher LH. 2002. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nature medicine*, 8 (6): 567-573.
85. Oda M, Kihara A, Yoshioka H, Saito Y, Watanabe N, Uoo K, Higashihara M, Nagahama M, Koide N, Yokoshi T, Sakurai J. 2008. Effect of Erythromycin on Biological Activities Induced by *Clostridium perfringens*  $\alpha$ -Toxins. *Pharmacology and Experimental Therapy*, 327(3):934-940.

86. Odbileg R, Lee S, Yoshida R, Chang KS, Ohashi K, Sugimoto C, Onuma M. 2004. Cloning and sequence analysis of llama cytokines related to cell-mediated immunity. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 99 (1-2): 1-10.
87. Odbileg R, Lee S, Ohashi K, Onuma M. 2005. Cloning and sequence analysis of llama (*Lama glama*): Th2 (IL-4, IL-10 and IL-13) cytokines. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 104 (3-4): 145-153.
88. Odbileg R, Purevtseren B, Batsukh Z, Konnai S, Ohashi K, Onuma M. 2006. Complete cDNA Sequences and Phylogenetic Analysis of the Th1 and Th2 Cytokines of the Bactrian Camel (*Camelus bactrianus*). *Journal of Veterinary medical Science*, 68(9): 941-946.
89. Odbileg R, Purevtseren B, Gantsetseg D, Boldbaatar B, Buyannemekh T, Galmandakh Z, Erdenebaatar J, Konnai S, Onuma M and Ohashi K. 2008. Cytokine responses in camels (*Camelus bactrianus*) vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 vaccine. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 70(2):197-201.
90. Ortega J, Crossley B, Dechant JE, Drew CP, MacLachlan NJ. 2010. Fatal Bluetongue Virus Infection in an Alpaca (*Vicugna Pacos*) in California. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22(1):134-136.
91. Opal SM, Depalo VA. 2000. Anti – inflammatory cytokines. *Chest*, 117: 1162-1172.
92. Palacios C, Perales R, Chavera A, López T. 2005. Caracterización anatómo-histopatológica de enteropatías causantes de mortalidad en crías de alpaca. *Rev. Investig. Vet* 16(1): 17-21.
93. Palacios CA, Perales RA, Chavera AE, López MT, Braga WU, Moro M. 2006. *Eimeria macusaniensis* and *Eimeria ivitaensis* co-infection in fatal cases of diarrhea in young alpacas (*Lama pacos*) in Peru. *Veterinary Record*, 158:344-345.
94. Pérez, DR. 2006. Genotipificación y subtipificación de *Clostridium perfringens* aislados de crías de alpacas muertas por enterotoxemia. Tesis para optar por el

título de Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima – Perú.

95. Porto A, Oliveira L, Ferraz L, Thomaz S, Rosa J, Roque-Barreira M. 2007. Isolation of bovine immunoglobulins resistant to peptic digestion: new perspectives in the prevention of failure in passive immunization of neonatal calves. *J Dairy Sci*, 90: 955-962.
96. Tykocinski L-oliver, Hajkova P, Chang HD, Stamm T, Sozeri O, Lohning M, Hu-Li J, Niesner U, Kreher S, Friedrich B, Pannetier C, Grutz G, Walter J, Paul WE, Radbruch A. 2005. A Critical Control Element for Interleukin-4 Memory Expression in T Helper Lymphocytes. *The journal of biological chemistry*, 280 (31): 28177-28185.
97. Park SS, Lillehoj HS, Allen PC, Park DW, FitzCoy S, Bautista DA, and Lillehoje EP. 2008. Immunopathology and cytokine responses in broiler chickens coinfectd with *Eimeria maxima* and *Clostridium perfringens* with the use of an animal model of necrotic enteritis. *Avian Dis.*, 52:14–22.
98. Pastorelli L, Garg RR, Hoang SB, Spinab L, Mattioli B, Scarpad M, Fiocchid F, Vecchib M, and Pizarroa TT. 2010. Epithelial-derived IL-33 and its receptor ST2 are dysregulated in ulcerative colitis and in experimental Th1/Th2 driven enteritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(17):8017-22.
99. Patil A., Hughes A., Zhang G. 2004. Rapid evolution and diversification of mammalian  $\alpha$ -defensins as revealed by comparative analysis of rodent and primate genes. *Physiol. Genomics*, 20: 1-11.
100. Ramírez A, Franco E, Pezo D, García W. 1998. Diagnóstico y control de enfermedades en CSA. Pub. Tec. FMV 34: 9-14.
97. Ramírez A, Huamán D, Ellis RP. 1985. Enterotoxemia de la alpaca. Programa colaborativo de apoyo a la investigación a rumiantes menores. Serie reporte técnico, p: 63, 1-17. Lima - Perú.



101. Rathinam VAK, Appledorn DM, Hoag KA, Amalfitano A, Mansfield LS. 2009. *Campylobacter jejuni*-Induced Activation of Dendritic Cells Involves Cooperative Signaling through Toll-Like Receptor 4. *Infection and immunity*, 77(6):2499-2507.
  
102. Reader, R., Hyde, D.M., Schelegle, E.S., Aldrich, M.C., Stoddard, A.M., McLane, M.P., Levitt, R.C., Tepper, J.S., 2003. Interleukin- 9 induces mucous cell metaplasia independent of inflammation. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 28, 664–672.
  
103. Rosadio R, Londoño P, Pérez D, Castillo H, Véliz A, Llanco L, Yaya K, Maturrano L. 2010. *Eimeria macusaniensis* associated lesions in neonate alpacas dying from enterotoxemia. *Veterinary parasitology*, 168 (1-2): 116-120.
  
104. Rosadio R. 2010. Mortalidad neonatal en alpacas. En: Cid, M. Sanidad de alpacas en la etapa neonatal. 1ª ed. Madrid: Editorial Complutense. 148 p.
  
105. Rottman JB, Tompkins WA, Tompkins MB. 1996. A Reverse Transcription-Quantitative Competitive Polymerase Chain Reaction (RT-qcPCR) Technique to Measure Cytokine Gene Expression in Domestic Mammals. *Veterinary Pathology*, 33(2):242-248.
  
106. Rutgeerts P, Vermeire S, Van Assche G. 2009. Biological therapies for inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 136:1182–1197.
  
107. Sánchez-Sánchez F, Mitnacht S. 2008. Nonsense-mediated decay: paving the road for genome diversification. *Bioessays*.30(10): 926-8.
  
108. Stevens DL. 2000. The pathogenesis of clostridial myonecrosis. *Int J Med Microbiol*, 290:497–502.
  
109. Servin AL, Liévin-Le V. 2006. The Front Line of Enteric Host Defense against Unwelcome Intrusion of Harmful Microorganisms□: Mucins, Antimicrobial Peptides, and Microbiota. *Clinical microbiology reviews*, 19(2):315-337.
  
110. Setoguchi R, Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. 2005. Homeostatic maintenance of natural Foxp3 (+) CD25 (+) CD4 (+) regulatory T cells by interleukin IL-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *JEM*, 201(5): 723- 735.

111. Siegesmund AM, Konkel ME, Klena JD, Mixer PF. 2004. *Campylobacter jejuni* infection of differentiated THP-1 macrophages results in interleukin 1 release and caspase-1-independent apoptosis. *Microbiology*, 150(3):561-569.
112. Siegmund B, Sennello JA, Lehr HA, Batra A, Fedke I, Zeitz M, Fantuzzi G. 2004. Development of intestinal inflammation in double IL-10- and leptin-deficient mice. *J. Leukoc. Biol.*, 76: 782- 786.
113. Souza M, Azevedo MSP, Jung K, Cheetham S and Saif LJ. 2008. Pathogenesis and Immune Responses in Gnotobiotic Calves after Infection with the Genogroup II.4-HS66 Strain of Human Norovirus. *J. Virol.*, 82 (4): 1777-1786.
114. Stirnweiss A, Ksienzyk A, Klages K, Rand U, Grashoff M, Hauser H, Kroger A. 2010. IFN regulatory factor-1 bypasses IFN-mediated antiviral effects through viperin gene induction. *Journal of immunology*, 184(9): 5179-5185.
115. Swindle MM. 1998. Surgery, Anesthesia and Experimental Techniques in Swine. Iowa State university Press.
116. Thomas RM, Chunder N, Chen C, Umetsu SE, Winandy S, Wells AD. 2007. Ikaros Enforces the Costimulatory Requirement for IL2 Gene Expression and Is Required for Anergy Induction in CD4+ T Lymphocytes. *The Journal of Immunology*, 179: 7305–7315.
117. Thornton AM, Donovan EE, Piccirillo CA, Shevach EM. 2004. Cutting Edge: IL-2 Is Critically Required for the In Vitro Activation of CD4 + CD25 + T Cell Suppressor Function. *J Immunol*, 172: 6519-652.
118. Tietze, K, Dalpke A, Morath S, Mutters R, Heeg K, and C. Nonnenmacher. 2006. Differences in innate immune responses upon stimulation with gram-positive and gram-negative bacteria. *J. Periodontal Res.*, 41:447–454.
119. Tizard I. 2009. Introducción a la inmunología veterinaria. Ed. Elsevier. 8va edición. Barcelona, España.
120. Tse DB, Young BK. 2011. Co-ordinate expression of Th1/Th2 phenotypes in maternal and fetal blood: evidence for a transplacental nexus. *Journal of Perinatal Medicine*, 40 (2): 165–170.
121. Wagner B, Burton A, Ainsworth D. 2010. Interferon-gamma, interleukin-4 and interleukin-10 production by T helper cells reveals intact Th1 and regulatory T<sub>R</sub>1 cell

activation and a delay of the Th2 cell response in equine neonates and foals. *Vet. Res*, 41(4): 41-47.

122. Weiss DJ, Evanson OA, Souza CD. 2006. Mucosal immune response in cattle with subclinical Johne's disease. *Veterinary pathology*, 43(2):127-135.

123. Werman A, et al. (2004) The precursor form of IL-1alpha is an intracrine proinflammatory activator of transcription. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101:2434-2439.

124. Wheeler JC. 1995. Evolution and present situation of the South American Camelidae. *Biol J Linn Soc*. 54: 271-295.

125. Wheeler JC. 2010. Clasificación de las alpacas (*Vicugna pacos*) dentro de los camélidos sudamericanos. En: Cid, M. Sanidad de alpacas en la etapa neonatal. 1ª ed. Madrid.

126. Wong ML, Medrano JF. 2005. Real Time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, 39:75-85.

127. Yaeger M, Yoon K-J, Schwartz K, Berkland L. 2004. West Nile Virus Meningoencephalitis in a Suri Alpaca and Suffolk Ewe. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 16(1):64-66.

128. Yagi R, Junttila IS, Wei G. 2010. The Transcription Factor GATA3 actively represses RUNX3 protein-regulated production of interferon- $\gamma$ . *Immunity*, 32(4): 507-517.

129. Yamanaka T, Helgeland L, Farstad I, Fukushima H, Midtvedt T, Brandtzaeg P. 2003. Microbial colonization drives lymphocyte accumulation and differentiation in the follicle-associated epithelium of Peyer's patches. *Immunol* 170:816-22.

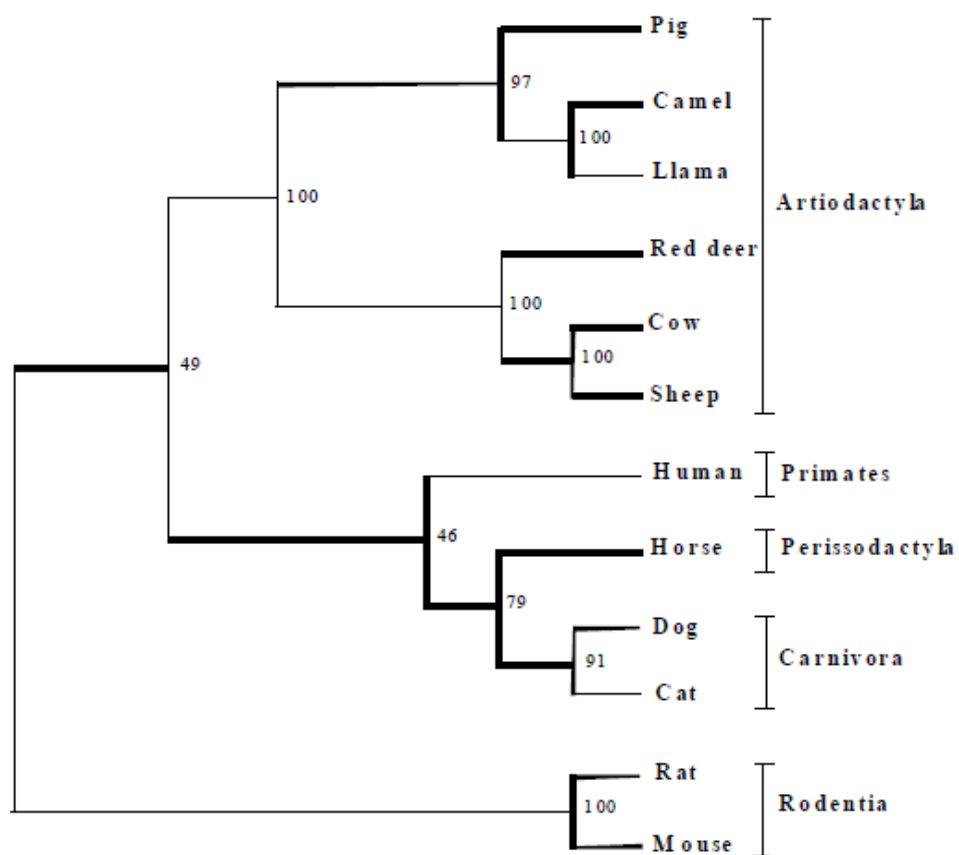
130. Yaya K, Rosadio R. 2005. Ensayo de tres programas de vacunación anticlostridial en alpacas. *Rev Inv Vet Perú*; 16 (1):49-55.

131. Zheng SG, Wang JH, Gray JD, Horwitz DA. 2004. Natural and Induced CD4 + CD25 + Cells Educate CD4 + CD25 – Cells to Develop Suppressive Activity: The Role of IL-2, TGF-  $\beta$ , and IL-10. *The Journal of Immunology*, 172: 5213-5221.
132. Zhou H, Gong J, Brisbin J, Yu H, Sarson AJ, Si W, Sharif S, Han Y. 2009. Transcriptional profiling analysis of host response to *Clostridium perfringens* infection in broilers. *Poultry science*, 88(5):1023-32.

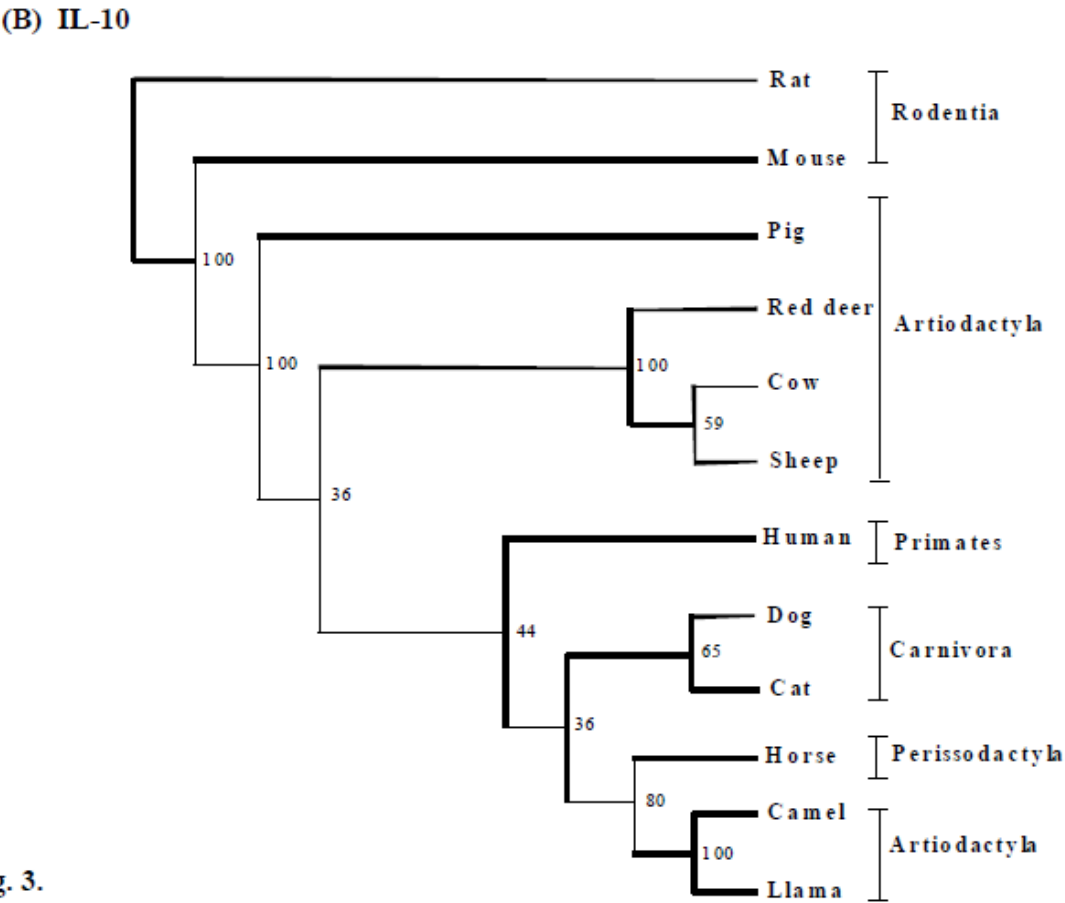
## VIII. ANEXOS

**Anexo 1.** Árbol filogenético elaborado a partir del alineamiento de una secuencia de IL-2 (Odbileg y col., 2006).

**(A) IL-2**



**Anexo 2.** Árbol filogenético elaborado a partir del alineamiento de una secuencia de IL-10 (Odbileg y col., 2006).



**Fig. 3.**

**Anexo 3.** Valores promedio de Ct de IFN $\gamma$ , GAPDH,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , varianza, Desviación estándar\* y Coeficiente de variación\*\* hallados en animales sanos y enfermos con enteropatía.

#### Sanos

| Edad     | Ct IFN $\gamma$ | Ct GAPDH | $2^{-\Delta\Delta Ct}$ | Varianza | SD*  | CD** |
|----------|-----------------|----------|------------------------|----------|------|------|
| Semana 1 | 37,20           | 24,88    | 192,81                 | 65,75    | 8,11 | 0,04 |
| Semana 2 | 37,03           | 25,28    | 285,78                 | 70,82    | 8,42 | 0,03 |
| Semana 3 | 36,15           | 26,03    | 882,26                 | 83,37    | 9,13 | 0,01 |
| Semana 4 | 36,45           | 26,63    | 1096,37                | 83,45    | 9,14 | 0,01 |
| Semana 5 | 36,78           | 26,75    | 943,73                 | 55,64    | 7,46 | 0,01 |
| Semana 6 | 35,67           | 24,67    | 482,02                 | 88,4     | 9,4  | 0,02 |

#### Con enteropatía

| Edad     | Ct IFN $\gamma$ | Ct GAPDH | $2^{-\Delta\Delta Ct}$ | Varianza | SD*    | CD** |
|----------|-----------------|----------|------------------------|----------|--------|------|
| Semana 1 | 35,41           | 28,61    | 8811,14                | 13809    | 117,51 | 0,01 |
| Semana 2 | 36,36           | 29,28    | 7274,45                | 12785    | 357,78 | 0,05 |
| Semana 3 | 35,96           | 27,76    | 3341,69                | 13794    | 160,61 | 0,05 |
| Semana 4 | 37,4            | 30,51    | 8328,84                | 13677    | 287,41 | 0,03 |
| Semana 5 | 34,83           | 28,02    | 8793,36                | 12782    | 162,64 | 0,02 |
| Semana 6 | 35,56           | 28,26    | 6417,06                | 15047    | 122,67 | 0,02 |

**Anexo 4.** Valores promedio de Ct de IL-2, GAPDH,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , varianza, Desviación estándar\* y Coeficiente de variación\*\* hallados en animales sanos y enfermos con enteropatía.

#### Sanas

| Edad     | Ct IL-2 | Ct GAPDH | $2^{-\Delta\Delta Ct}$ | Varianza | SD*  | CD** |
|----------|---------|----------|------------------------|----------|------|------|
| Semana 1 | 28,58   | 24,3     | 0,05                   | 0,0001   | 0,01 | 0,19 |
| Semana 2 | 28,28   | 25,28    | 0,13                   | 0,0004   | 0,02 | 0,16 |
| Semana 3 | 29,35   | 25,01    | 0,05                   | 0,0002   | 0,01 | 0,18 |
| Semana 4 | 24,78   | 26,63    | 3,62                   | 0,04     | 0,19 | 0,05 |
| Semana 5 | 28,83   | 26,2     | 0,16                   | 0,04     | 0,03 | 0,18 |
| Semana 6 | 26,87   | 25,54    | 0,4                    | 0,0002   | 0,05 | 0,13 |

#### Enfermas

| Edad     | Ct IL-2 | Ct GAPDH | $2^{-\Delta\Delta Ct}$ | Varianza | SD*   | CD** |
|----------|---------|----------|------------------------|----------|-------|------|
| Semana 1 | 29,52   | 28,49    | 471,36                 | 258,34   | 16,07 | 0,03 |
| Semana 2 | 30,89   | 29,82    | 459,69                 | 423,97   | 20,59 | 0,04 |
| Semana 3 | 28,87   | 28,03    | 536,87                 | 217,83   | 14,76 | 0,03 |
| Semana 4 | 30,43   | 30,51    | 1019,45                | 521,82   | 22,84 | 0,02 |
| Semana 5 | 29,11   | 28,26    | 533,86                 | 167,36   | 12,94 | 0,02 |
| Semana 6 | 30      | 28,71    | 392,36                 | 447,06   | 21,14 | 0,05 |



**Anexo 5.** Valores promedio de Ct de IL-4, GAPDH,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , varianza, Desviación estándar\* y Coeficiente de variación\*\* hallados en animales sanos y enfermos con enteropatía.

#### Sanas

| Edad     | Ct IL-4 | Ct GAPDH | $2^{-\Delta\Delta Ct}$ | Varianza | SD*  | CD** |
|----------|---------|----------|------------------------|----------|------|------|
| Semana 1 | 33,67   | 24,63    | 81,67                  | 38,64    | 6,22 | 0,08 |
| Semana 2 | 34,73   | 25,28    | 65,41                  | 27,5     | 5,24 | 0,08 |
| Semana 3 | 33,5    | 25,74    | 211,03                 | 36,66    | 6,06 | 0,03 |
| Semana 4 | 33,81   | 26,63    | 315,94                 | 1,17     | 1,08 | 0,01 |
| Semana 5 | 34,97   | 26,75    | 153,67                 | 60,54    | 7,78 | 0,05 |
| Semana 6 | 34,43   | 25,35    | 84,26                  | 23,4     | 4,84 | 0,06 |

#### Con enteropatía

| Edad     | Ct IL-4 | Ct GAPDH | $2^{-\Delta\Delta Ct}$ | Varianza | SD*    | CD** |
|----------|---------|----------|------------------------|----------|--------|------|
| Semana 1 | 34,45   | 28,83    | 929,53                 | 512,91   | 22,65  | 0,02 |
| Semana 2 | 34,17   | 29,28    | 1541,82                | 7122,96  | 84,4   | 0,05 |
| Semana 3 | 32,88   | 27,87    | 1419,08                | 2507,03  | 50,07  | 0,04 |
| Semana 4 | 34,19   | 30,64    | 3889,09                | 9081,76  | 95,3   | 0,02 |
| Semana 5 | 33,34   | 28,02    | 1355,4                 | 1520,23  | 123,29 | 0,09 |
| Semana 6 | 34,19   | 28,52    | 865,21                 | 367,34   | 19,17  | 0,02 |

**Anexo 6.** Valores promedio de Ct de IL-10, GAPDH,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , varianza, Desviación estándar\* y Coeficiente de variación\*\* hallados en animales sanos y enfermos con enteropatía.

Sanas

| Edad     | Ct IL-10 | Ct GAPDH | $2^{-\Delta\Delta Ct}$ | Varianza | SD*   | CD** |
|----------|----------|----------|------------------------|----------|-------|------|
| Semana 1 | 29,07    | 24,3     | 90,19                  | 102,18   | 10,11 | 0,11 |
| Semana 2 | 28,39    | 25,28    | 281,58                 | 383,9    | 19,59 | 0,07 |
| Semana 3 | 28,02    | 25,01    | 302,79                 | 202,53   | 14,23 | 0,05 |
| Semana 4 | 28,81    | 26,63    | 540,82                 | 416,4    | 20,41 | 0,04 |
| Semana 5 | 28,97    | 26,2     | 357,24                 | 472,54   | 21,74 | 0,06 |
| Semana 6 | 28,57    | 25,54    | 299,22                 | 539,61   | 23,23 | 0,08 |

Con enteropatía

| Edad     | Ct IL-10 | Ct GAPDH | $2^{-\Delta\Delta Ct}$ | Varianza | SD*   | CD** |
|----------|----------|----------|------------------------|----------|-------|------|
| Semana 1 | 30,57    | 28,65    | 645,38                 | 785,15   | 28,02 | 0,04 |
| Semana 2 | 31,58    | 29,82    | 721,51                 | 545,96   | 73,86 | 0,1  |
| Semana 3 | 29,52    | 27,76    | 720,93                 | 778,3    | 84,13 | 0,12 |
| Semana 4 | 32,59    | 30,51    | 906,3                  | 867,75   | 29,46 | 0,03 |
| Semana 5 | 30,4     | 28,02    | 467,57                 | 395,12   | 19,88 | 0,04 |
| Semana 6 | 30,76    | 28,26    | 430,23                 | 490,23   | 22,14 | 0,05 |

**Anexo 7.** Resultados del Software Stata SE 10.1 para: a) la comparación sanos y enfermos para IFN $\gamma$  (T de Student), b) expresión de IFN $\gamma$  en animales sanos según semana de edad (ANOVA), c) expresión de IFN $\gamma$  en animales enfermos según semana de edad (ANOVA).

a)Two-sample t test with equal variances

| -----+-----                         |     |                        |                         |                    |                      |           |
|-------------------------------------|-----|------------------------|-------------------------|--------------------|----------------------|-----------|
| Variable                            | Obs | Mean                   | Std. Err.               | Std. Dev.          | [95% Conf. Interval] |           |
| -----+-----                         |     |                        |                         |                    |                      |           |
| sanos                               | 29  | 582.8928               | 61.07983                | 328.925            | 457.7764             | 708.0091  |
| enfermos                            | 33  | 7153.998               | 351.3126                | 2018.137           | 6438.398             | 7869.598  |
| -----+-----                         |     |                        |                         |                    |                      |           |
| combined                            | 62  | 4080.416               | 459.8809                | 3621.106           | 3160.828             | 5000.005  |
| -----+-----                         |     |                        |                         |                    |                      |           |
| diff                                |     | -6571.105              | 379.4717                |                    | -7330.162            | -5812.049 |
| -----+-----                         |     |                        |                         |                    |                      |           |
| diff = mean(sanos) - mean(enfermos) |     |                        |                         | t = -17.3165       |                      |           |
| Ho: diff = 0                        |     |                        | degrees of freedom = 60 |                    |                      |           |
|                                     |     |                        |                         |                    |                      |           |
| Ha: diff < 0                        |     | Ha: diff != 0          |                         | Ha: diff > 0       |                      |           |
| Pr(T < t) = 0.0000                  |     | Pr( T  >  t ) = 0.0000 |                         | Pr(T > t) = 1.0000 |                      |           |

b) Anova IFN $\gamma$  edad

| Source      | Partial SS | df | MS         | F       | Prob > F |
|-------------|------------|----|------------|---------|----------|
| -----+----- |            |    |            |         |          |
| Model       | 3027659.81 | 5  | 605531.962 | 8163.71 | 0.0000   |
|             |            |    |            |         |          |
| procs       | 3027659.81 | 5  | 605531.962 | 8163.71 | 0.0000   |
|             |            |    |            |         |          |

|          |  |            |    |           |
|----------|--|------------|----|-----------|
| Residual |  | 1705.99301 | 23 | 74.173609 |
|----------|--|------------|----|-----------|

-----+-----

|       |  |           |    |            |
|-------|--|-----------|----|------------|
| Total |  | 3029365.8 | 28 | 108191.636 |
|-------|--|-----------|----|------------|

c) Anova IFN $\gamma$ Enf edad

|        |  |            |    |    |   |          |
|--------|--|------------|----|----|---|----------|
| Source |  | Partial SS | df | MS | F | Prob > F |
|--------|--|------------|----|----|---|----------|

-----+-----

|       |  |           |   |            |        |        |
|-------|--|-----------|---|------------|--------|--------|
| Model |  | 129023124 | 5 | 25804624.7 | 532.28 | 0.0000 |
|-------|--|-----------|---|------------|--------|--------|

|

|       |  |           |   |            |        |        |
|-------|--|-----------|---|------------|--------|--------|
| procs |  | 129023124 | 5 | 25804624.7 | 532.28 | 0.0000 |
|-------|--|-----------|---|------------|--------|--------|

|

|          |  |            |    |            |
|----------|--|------------|----|------------|
| Residual |  | 1308945.47 | 27 | 48479.4619 |
|----------|--|------------|----|------------|

-----+-----

|       |  |           |    |            |
|-------|--|-----------|----|------------|
| Total |  | 130332069 | 32 | 4072877.16 |
|-------|--|-----------|----|------------|

**Anexo 8.** Resultados del Software Stata SE 10.1 para: a) la comparación sanos y enfermos para IL4 (T de Student), b) Prueba de Tukey para identificar grupos etarios estadísticamente distintos dentro de los sanos.

|   |     |                        |                         |                    |                      |           |
|---|-----|------------------------|-------------------------|--------------------|----------------------|-----------|
| a) Two-sample t test with equal variances |     |                        |                         |                    |                      |           |
| -----                                     |     |                        |                         |                    |                      |           |
| Variable                                  | Obs | Mean                   | Std. Err.               | Std. Dev.          | [95% Conf. Interval] |           |
| -----+                                    |     |                        |                         |                    |                      |           |
| sanos                                     | 31  | 135.6255               | 13.61372                | 75.798             | 107.8226             | 163.4284  |
| enfermos                                  | 27  | 1454.122               | 145.0008                | 753.446            | 1156.069             | 1752.176  |
| -----+                                    |     |                        |                         |                    |                      |           |
| combined                                  | 58  | 749.4084               | 110.0232                | 837.9116           | 529.0908             | 969.7261  |
| -----+                                    |     |                        |                         |                    |                      |           |
| diff                                      |     | -1318.497              | 135.9306                |                    | -1590.798            | -1046.195 |
| -----                                     |     |                        |                         |                    |                      |           |
| diff = mean(sanos) - mean(enfermos)       |     |                        |                         | t = -9.6998        |                      |           |
| Ho: diff = 0                              |     |                        | degrees of freedom = 56 |                    |                      |           |
|   |     |                        |                         |                    |                      |           |
| Ha: diff < 0                              |     | Ha: diff != 0          |                         | Ha: diff > 0       |                      |           |
| Pr(T < t) = 0.0000                        |     | Pr( T  >  t ) = 0.0000 |                         | Pr(T > t) = 1.0000 |                      |           |

b) Test de Tukey en el grupo de animales sanos (El símbolo \* implica diferencia estadística significativa)

| grp vs grp | group means |          | dif      | HSD-test |
|------------|-------------|----------|----------|----------|
| -----      |             |          |          |          |
| 1 vs 2     | 81.6756     | 65.5000  | 16.1756  | 5.4008*  |
| 1 vs 3     | 81.6756     | 211.0333 | 129.3578 | 43.1910* |
| 1 vs 4     | 81.6756     | 315.9400 | 234.2644 | 78.2181* |
| 1 vs 5     | 81.6756     | 153.6700 | 71.9944  | 24.0381* |
| 1 vs 6     | 81.6756     | 84.2617  | 2.5861   | 0.8635   |

|        |          |          |          |          |
|--------|----------|----------|----------|----------|
| 2 vs 3 | 65.5000  | 211.0333 | 145.5333 | 48.5919* |
| 2 vs 4 | 65.5000  | 315.9400 | 250.4400 | 83.6190* |
| 2 vs 5 | 65.5000  | 153.6700 | 88.1700  | 29.4389* |
| 2 vs 6 | 65.5000  | 84.2617  | 18.7617  | 6.2643*  |
| 3 vs 4 | 211.0333 | 315.9400 | 104.9067 | 35.0271* |
| 3 vs 5 | 211.0333 | 153.6700 | 57.3633  | 19.1529* |
| 3 vs 6 | 211.0333 | 84.2617  | 126.7717 | 42.3276* |
| 4 vs 5 | 315.9400 | 153.6700 | 162.2700 | 54.1800* |
| 4 vs 6 | 315.9400 | 84.2617  | 231.6783 | 77.3547* |
| 5 vs 6 | 153.6700 | 84.2617  | 69.4083  | 23.1746* |